ARCHIVES ROUMAINES
DE
PATHOLOGIE EXPÉRIMENTALE
ET DE
MICROBIOLOGIE

ARCHIVES ROUMAINES

DE

PATHOLOGIE EXPÉRIMENTALE

ET DE

MICROBIOLOGIE

Fondées par I. CANTACUZINO

Dirigées par:

C. IONESCO-MIHĂIEŞTI, M. CIUCĂ, AL. CIUCĂ,
D. COMBIESCO et P. CONDREA

Tome 19 — 1960

Publiées par:
INSTITUTUL «Dr. I. CANTACUZINO»
SPL. INDEPENDENŢEI, 103 – BUCUREŞTI 35

Publication périodique trimestrielle

ARCHIVES ROUMAINES
DE PATHOLOGIE EXPÉRIMENTALE
ET DE MICROBIOLOGIE

TOME 19 *No. 1* *MARS 1960*

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DES SYSTÈMES PHAGO-BACTÉRIENS ENTÉRIQUES ISOLÉS DES EAUX DU LAC DE TEKIRGHIOL

par

M. CIUCĂ, T. MEITERT et EUGENIA MEITERT

(Travail de l'Institut «Dr. I. Cantacuzino» — Centre National de Bactériophages-Références et Service de la Dysenterie)

— Manuscrit reçu le 19 octobre 1959 —

Les premières variantes lysogènes, obtenues par BORDET et CIUCĂ (1, 2, 3) [illegible] par l'action du phage entérique «primitif» sur différentes souches [illegible] en 1922, des souches spontanément [illegible] attiré dès le

ERRATA

Page 588 — Hydrolyse de l'amidon par M. pellegrini 5: lire + au lieu de —
„ 588 — Décomposition de la tyrosine par M. smegmatis Rome 1951: lire — au lieu de +
„ 589 — fermentation du tréhalose par M. smegmatis Paris 1957: lire + au lieu de —
„ 590 — alinéat 3, ligne 9 — lire Myc. smegmatis 365 au lieu de Myc. smegmatis 565
„ 593 — fermentation du sorbite par les M. atypiques 35 A: lire — au lieu de +
„ 594 — ligne 5 — lire: v. tableau III au lieu de v. tableau II
„ 596 — fermentation du rhamnose par les M. pellegrini lire: 0 au lieu de 9
„ 606 — ligne 1 — lire (29, 30, 31) au lieu de (30, 31, 32)
„ 630 — graphique 4, première rangée — lire 41 au lieu de 4

[illegible]
— le spectre d'activité [illegible] tériacées;
— la flore microbienne d'origine entérique dans les échantillons d'eau [illegible],
— le caractère de lysogénéité des souches microbiennes isolées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

On a récolté, de 20 points différents, des échantillons d'eau (le 11 et 20 juillet 1956): du lac de Tekirghiol (schéma No. 1), en face des stations balnéaires (T., Ef. et V. R.), du centre du lac, ainsi que des fosses septiques et canaux déverseurs de la station de Tekirghiol.

Les échantillons ont été récoltés de la surface de l'eau, à l'aide de récipients en verre (stérilisés).

Immédiatement après la récolte, l'eau a été transportée au laboratoire et soumise aux examens bactériologiques.

Le contrôle du bactériophage a été effectué directement (eau filtrée par Seitz EK et séparément l'eau inactivée une heure à 60°C), ainsi qu'après enrichissements monovalents avec les souches témoins lysosensibles couramment utilisées à l'Institut «Dr. I. Cantacuzino», (Coli Brx., typhi A, typhi 0_{901}, Shiga L_4, Flexner D, Para B_{76}, de même que la souche B. pyocyanique M) à partir d'un mélange de 50 ml eau à analyser avec 50 ml bouillon. Les enrichissements ont été effectués journellement. Après chaque enrichissement, le produit a été inactivé pendant une heure à 60°C.

La sensibilité des différentes souches vis-à-vis des phages isolés a été étudiée par la méthode classique (boîtes de Petri), utilisant les aires de culture, auxquelles on a ajouté avec l'anse une goutte du produit.

Pour l'isolement de la flore microbienne, les échantillons ont été ensemencés par dispersion sur milieu Istrati-Meitert, avec bile sèche (5), ainsi que sur gélose simple (boîtes de Petri). Après 24 et 48 heures d'incubation, on a repiqué différentes colonies, étudiées par la suite du point de vue morphologique, biochimique et antigénique.

Pour une partie des échantillons, on a pratiqué la colimétrie ou bien on a compté les germes saprophytes, d'après les techniques utilisées pour le contrôle de routine de l'état de pureté de l'eau.

La lysogénie des souches a été analysée selon la méthode classique d'inactivation d'une culture en bouillon de 24 heures, pendant une demi-heure à 59°C, suivie d'enrichissements monovalents et polyvalents avec les souches test lysosensibles, indiquées plus haut.

RÉSULTATS

A l'examen de l'action directe des épreuves d'eau, 14 échantillons inactivés, provenant de 14 points de récolte, présentent des plages ou zones de lyse, et notamment: 14 épreuves possèdent des bactériophages pour le b. coli Brx. et 2 épreuves pour le b. Flexner D et pour le b. Shiga L_4 (Tableau I).

Tableau I

Action directe des épreuves d'eau (inactivées 1 heure à 60°) sur les souches lysosensibles

Eau inactivée des points	Souches lysosensibles					
	Coli Brx.	Flexner D	Shiga L_4	Typhique 0_{901}	Typhique A	Pyocyanique M
1	+ns	0	0	0	0	0
5	CL	0	0	0	0	0
6	SCL	0	0	0	0	0
7	SCL	0	0	0	0	0
8	+n	0	0	0	0	0
9	2+n	0	0	0	0	0
10	3+n	0	0	0	0	0
11	1+n	0	0	0	0	0
12	1+n	0	0	0	0	0
15	+s	0	0	0	0	0
17	+s	0	0	0	0	0
23	SCL	0	0	0	0	0
24	CL	CL	CL	0	0	0
25	CL	CL	CL	0	0	0

Légende: CL = lyse confluente; SCL = lyse semi-confluente;
n = plage normale; s = petite plage;
4 = 0—5 plages; 1 + = 5—10 plages; 2 + = nombreuses plages;
3+ = très nombreuses plages.

Au cours de 6 enrichissements monovalents successifs, avec les différentes souches lysosensibles, on a mis en évidence un nombre supplémentaire de plages et zones de lyse pour les souches Coli Brx., Flexner D, Shiga L_4, Typhi A et pyocyanique.

Tableau II

Plages et aires de lyse, mises en évidence dans les épreuves d'eau, après 6 enrichissements monovalents

Eau inactivée des points	Souches lysosensibles						
	Coli Brx.	Flexner D	Shiga L_4	Typhique A	Paratyphique B	Typhique 0_{901}	Pyocyanique M
1	CL	CL+cr	CL	CL	0	0	0
1a	CL+cr	CL	CL	0	0	0	0
3	CL	CL	CL	0	0	0	0
5	CL+cr	0	0	0	0	0	CL+cr
6	CL	CL+cr	0	0	0	0	0
8	CL+cr	CL	CL	CL	1+n	0	CL+cr
9	0	CL	CL	0	0	0	0
12	+n	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	CL+cr
14	3+n	0	0	0	0	0	0
21	0	CL	0	0	0	0	CL+cr
23	CL	0	0	0	0	0	CL+cr
24	CL	0	0	0	0	0	0
25	CL	0	0	0	0	0	0

Légende: CL = lyse confluente; SCL = semi-confluente; n = plage normale; s = petite plage; 4 = 0 — 5 plages; 1+ = 5 — 10 plages; 2+ = nombreuses plages; 3+ = très nombreuses plages; cr = culture résistante.

En contrôlant le spectre d'action des bactériophages isolés, nous avons constaté:

a) Les bactériophages obtenus pour le b. typhique A étaient actifs pour la souche de b. typhique 0_{901}, et après enrichissements (avec le b. typhique A) aussi vis-à-vis du b. Shiga L_4.

b) Les phages obtenus pour le b. Flexner D, après enrichissements répétés (avec la souche Flexner D) n'étaient actifs que pour le b. Flexner.

c) Les phages obtenus pour le b. Shiga, après enrichissement sur cette souche, se sont montrés généralement spécifiques pour b. Shiga, parfois avec action lytique supplémentaire pour le b. typhique 0_{901}.

d) Les phages obtenus pour la souche Coli Brx. se sont montrés actifs (surtout après enrichissement sur la souche Coli Brx.), aussi bien envers le b. dysentérique (Flexner et Shiga), qu'envers le b. typhique (typhi A et typhi 0_{901}).

e) Les phages obtenus pour le b. pyocyanique M se sont montrés constamment spécifiques seulement pour le b. pyocyanique M.

La plus grande variété de bactériophages a été trouvée dans les points correspondant à un maximum d'agglomération de germes (point de récolte, 1,1 a, 3, 8, 9, 24, 25), provenant des fosses septiques de la proximité du lac, ainsi qu'au point de déversement des canaux dans le lac, correspondant à ces fosses,

alors que dans les échantillons récoltés du milieu du lac, on n'a pu mettre en évidence la présence du bactériophage, dans les prises d'eau analysées.

Dans toutes les épreuves d'eau examinées, on a trouvé une flore saprophyte abondante. Les bacilles Gram négatifs aérobes ont particulièrement attiré notre attention. Parmi ceux-ci prédominaient des bacilles «lactose-négatifs», donnant sur le milieu avec bile sèche, de grandes colonies, colorées en bleu-foncé, légèrement mobiles, fermentant constamment le glucose (avec ou sans production de gaz) assez souvent le maltose et le manite et, d'une manière variable, les autres sucres (sorbite, xylose, rhamnose, inosite, adonite), le dulcite étant rarement attaqué. La réaction de l'indol a presque constamment été négative.

De toutes les épreuves d'eau, on a également isolé des b. Coli, plus rarement des b. proteus (3 souches), b. pyocyanique (3 souches), b. faecalis alcaligenes (1 souche) et 14 souches non-identifiées.

Dans aucune des épreuves d'eau examinées, on n'a isolé des b. entériques pathogènes. Nous mentionnons que, pendant cette période, on a recherché la présence de b. entériques pathogènes, dans un nombre supplémentaire d'épreuves (plus de 350), dont on n'a jamais isolé de germes pathogènes, fait relaté d'ailleurs dans un ouvrage antérieur (6).

On a spécialement étudié 57 souches (22 b. Coli, 24 b. Paracoli, 3 b. proteus, 3 b. pyocyaniques, 1 b. faecalis alcaligenes, 4 non-identifiées), du point de vue caractères lysogènes, d'après la technique décrite au début.

Par enrichissements monovalents, on n'a pu mettre en évidence des phages endogènes.

Par enrichissements polyvalents (mélange de souches indicatrices lysosensibles), les cultures inactivées en bouillon, correspondant à un nombre de 42 souches (19 b. Coli, 20 b. Paracoli, 3 b. pyocyaniques) ont déterminé des plages ou aires de lyse sur b. Shiga L_4, b. typhi 0_{901} et dans un nombre plus réduit sur b. Coli Brx. (25 cas) et b. Flexner D (13 cas.)

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La grande majorité des auteurs sont actuellement d'accord que la fréquence et la distribution des phages dans la nature ne diffèrent pas de celles des bactéries, auxquelles elles sont indissolublement liées par leur vie «strictement parasitaire», dans les conditions écologiques d'habitat: intestin, exsudats pathologiques, eaux polluées, matières fécales humaines, animaux et eaux d'égout.

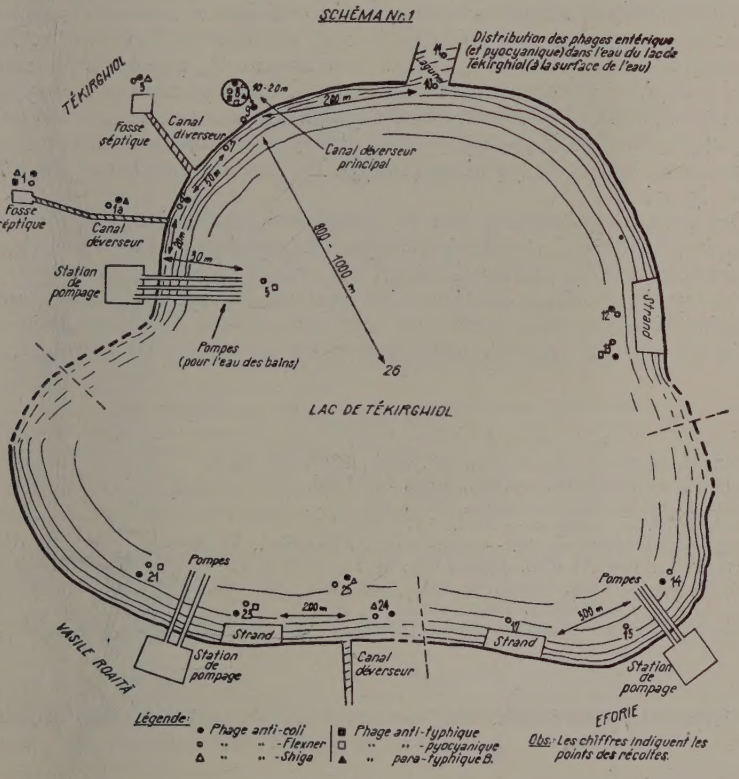
La conservation et la multiplication des bactériophages sont étroitement liées à l'existence des souches lysogènes qui se trouvent dans différents degrés de symbiose avec le bactériophage, aux conditions de maturation du phage symbiotique, ainsi qu'à la présence des souches lysosensibles, aux dépens desquelles a lieu la multiplication explosive du phage lytique et la maturation du phage «symbiotique», immature de la cellule-hôte.

Boyd (7), de même que les auteurs roumains (8) soulignent « l'unité » écologique qui existe dans la nature entre l'origine et la distribution des phages, dans le milieu ambiant, d'une part, et l'existence des souches lysogènes, d'autre part.

Dans les conditions particulières de milieu, du lac de Tekirghiol (hypersalinité, flore microbienne saprophyte abondante soumise, en grande partie, surtout en été, à l'action des rayons solaires ultra-violets, la présence de stations balnéo-climatiques riveraines à canaux, qui se déversent partiellement sans épuration préalable dans le lac, ainsi qu'à des systèmes de captation de l'eau du

lac à destinations thérapeutiques (bains, avec retour de l'eau dans le lac, etc.) l'existence de certains systèmes phago-bactériens entériques était à présumer.

La présence des bactériophages entériques et surtout du phage Coli multivalent, actif pour: les b. Coli, b. dysentériques et b. typhiques, tant dans le



contrôle direct des échantillons d'eau, qu'après enrichissements monovalents avec diverses souches lysosensibles surtout dans les points du maximum de pollution du lac (schéma Nr. 1), est en contraste flagrant avec l'absence totale du bactériophage dans les échantillons d'eau provenant du milieu du lac.

De même, la plus grande variété de bactériophages (Coli, dysentériques, typhiques, pyocyaniques) se trouve dans les points les plus contaminés: No.1, No.3, No.6, No.9 (fosses septiques, point de déversement) pour diminuer à mesure qu'on s'éloigne de ces régions jusqu'à disparition totale à 800—1000 m. de la rive (centre du lac).

Il est à remarquer qu'en été (1956) le contrôle direct (sans enrichissement) des bactériophages entériques dans les échantillons d'eau provenant des points plus ou moins contaminés, mentionnés plus haut, donne des résultats positifs, alors qu'au début du mois de mars 1957, pendant la fonte des neiges, dans les

mêmes zones, les bactériophages ont pu être mis en évidence seulement après enrichissements répétés.

Quant au spectre d'action des phages isolés, nous tenons à souligner l'aspect particulier des bactériophages anti-Flexner et anti-pyocyaniques, qui, contrairement aux phages anti-Shiga, anti-typhique et surtout anti-Coli, n'ont pas acquis des valences supplémentaires, après enrichissements monovalents.

Parmi les souches microbiennes isolées, ce sont les b. Coli et b. Para-coli qui ont prédominé (caractères décrits antérieurement) possédant de nombreux phages endogènes multivalents (vis-à-vis des b. Coli, dysentériques et typhiques). Les souches de b. Coli se sont montrées lysogènes, dans une proportion de 86,3% et les souches de b. Para-coli, en proportion de 83,3%, plus 3 souches de b. pyocyaniques, également lysogènes (100%). Du total des souches étudiées 73,68% étaient lysogènes.

Des données présentées, dans les conditions particulières de milieu, ressort le rôle important qui revient à l'analyse des systèmes phago-bactériens dans l'appréciation de l'état d'impurification des eaux de surface.

Ces systèmes phago-bactériens et surtout les systèmes entériques sont néanmoins beaucoup plus nombreux et complexes que les possibilités de mise en évidence par les procédés techniques dont on dispose actuellement.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bordet J. et Ciucă M. — C.R. Soc. Biol., 1920, **83**, 1293.
2. Bordet J. et Ciucă M. — Ibid., 1920, **83**, 1296.
3. Bordet J. et Ciucă M. — Ibid., 1921, **84**, 747.
4. Lisbonne M. et Carrere — Ibid., 1922, **85**, 56.
5. Istrati Gh. et Meitert T. — Rev. Igiena, Microbiol., Epidemiol., 1953, No. 6, 40.
6. Meitert T., Istrati Gh., Negru Fl. et Leondarie V. — Com. Soc. St. Med., 29, III, 1958, (publ. Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1958, **17**, 513).
7. Boyd I.S.K. — J. Path. a. Bact., 1950, **63**, 445.
8. Ciucă M. et coll. — Studii şi Cercet. Inframicrobiol., Microbiol. şi Parazitol., 1955, **6**, 341.

К ИЗУЧЕНИЮ КИШЕЧНЫХ ФАГО-БАКТЕРИЙНЫХ СИСТЕМ, ВЫДЕЛЕННЫХ В ВОДЕ ОЗЕРА ТЕКИРГИОЛ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Изучали некоторые особенности биологии кишечных фагов в особых условиях среды, представляемых озером Текиргиол (высокая концентрация соли, обилие сапрофитной микробной флоры, наличие курортов с канализационными системами, вливающимися в озеро и т. д.). Для этих целей брали в разные сроки образцы воды из озера, в 20 различных пунктах, изучая: наличие свободных бактериофагов в воде озера Текиргиол, непосредственно и после повторных обогащений, спектр действия этих фагов по отношению к разным штаммам кишечных бактерий, наличие микробной флоры, принадлежащей к кишечной группе в образцах воды и лизогенность выделенных микробных штаммов.

Установлено присутствие кишечных бактериофагов и в особенности поливалентного фага коли, активного как по отношению к кишечной палочке, так и по отношению к штаммам дизентерийной и тифозной палочки, как при непосредственном исследовании образцов воды, так и после моновалентных обогащении с разными лизочувствительными штаммами, в особенности в местах максимального загрязнения озера (наличие вливающихся каналов) в противоположности с полным отсутствием бактериофага в образцах воды, происходящих из середины озера.

Выявление кишечных бактериофагов удавалось летом (в августе) путем непосредственного исследования (без обогащений), в то время как в начале марта (в период таяния

снега) в тех же местах кишечные бактериофаги выявлялись только после повторных обогащений.

Спектр действия выделенных фагов оказался поливалентным, в особенности для бактериофагов против кишечной палочки.

Среди выделенных микробных штаммов преобладают штаммы кишечной и паракишечной палочки, содерживающие часто эндогенные фаги с поливалентным спектром лизогении (по отношению к кишечной, дизентерийной и тифозной палочке). В общем 73,68% изучаемых штаммов оказались лизогенными.

BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER AUS DEM WASSER DES TEKIRGHIOL SEES ISOLIERTEN PHAGEN-ENTEROBAKTERIACEENSYSTEME

ZUSAMMENFASSUNG

Unter den besonderen Umweltbedingungen, die der Tekirghiol See aufweist (erhöhter Salzgehalt, reichhaltige saprophytische Flora, das Vorhandensein von Kurorten am Seeufer, deren Kanalisierungssysteme in den See münden, u.s.w.), wurden einige Aspekte der Biologie enterischer Phagen untersucht. Zu diesem Zweck wurden, zu verschiedenen Zeitpunkten, Wasserproben an verschiedenen Stellen des Sees entnommen. Die Untersuchung bezog sich auf die Anwesenheit freier Bakteriophagen im Seewasser (direkt und nach wiederholter Anreicherung), auf das Wirkungsspektrum dieser Phagen gegenüber verschiedenen Stämmen von Enterobakteriaceen, die Enterobakteriaceenflora in den Wasserproben und den lysogenen Charakter der isolierten Mikrobenstämme.

Die Anwesenheit enterischer Bakteriophagen und insbesonders eines multivalenten, sowohl auf Colibazillen, als auch auf Stämme von Dysenterie- und Typhusbazillen wirkenden Coliphagen, wurde sowohl durch direkte Untersuchung der Wasserproben, als auch nach monovalenter Anreicherung mit verschiedenen lysosensiblen Stämmen festgestellt. Derartige Phagen wurden hauptsächlich an Stellen grösster Verunreinigung des Sees (durch einmündende Abzugskanäle) angetroffen, im Gegensatz zu ihrem vollständigen Fehlen im Wasser aus der Mitte des Sees.

Im Sommer konnten die enterischen Bakteriophagen durch einfache direkte Untersuchung (ohne Anreicherung) nachgewiesen werden, während zu Anfang des Monats März (zur Zeit der Schneeschmelze) enterische Phagen, an den gleichen Stellen, nur nach wiederholter Anreichung nachweisbar waren.

Das Wirkungsspektrum der isolierten Phagen, insbesonders der Coliphagen, war multivalent.

Unter den isolierten Mikrobenstämmen herrschten Coli- und Paracolibazillen vor, die zum grossen Teil endogene Phagen mit multivalentem Lysogeniespektrum beherbergten (wirksam gegenüber Colibazillen, Dysenteriebazillen und Typhusbazillen). Im ganzen waren 73,68% der untersuchten Stämme lysogen.

CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF PHAGE-ENTEROBACTERIAL SYSTEMS ISOLATED FROM THE WATER OF LAKE TEKIRGHIOL

SUMMARY

Some biological aspects of enteric phages were studied, as displayed in the particular environmental conditions obtaining in the Tekirghiol Lake (hypersalinity, abundant saprophytic microbial flora, presence of health resorts whose drainage systems are emptying into the lake, etc.). For this purpose, samples of lake water were collected at various times from 20 different sites. The investigations concerned: the presence of free bacteriophages in the water of Lake Tekirghiol, directly and after repeated enrichment, the spectrum of activity of these phages versus various strains of enterobacteriaceae, the microbial flora of an enteric nature in the samples of water collected, and the lysogenicity characters of the microbial strains isolated.

Direct examination as well as testing after monovalent enrichment with various lysosensitive strains showed enteric bacteriophages to exist in the samples, especially multivalent coli phage acting upon colon bacilli as well as upon strains of dysenteric and typhoid bacilli. Such phages were present in greater numbers in points of maximal pollution of the lake (due

to the presence of sewers), in contradistinction to their total absence in samples collected from the middle of the lake.

In summer enteric bacteriophages were demonstrable upon simple direct examination (without enrichment), while at the beginning of the month of March (at the time when the snow was melting), in samples from the same sites bacteriophages could only be demonstrated after repeated enrichment.

The spectrum of activity of the isolated phages was multivalent, especially in the case of coli phages.

Among the microbial strains isolated, colon and paracolon bacilli were prevailing. In many cases they proved to contain endogenous phages possessing a multivalent lysogenic spectrum (against colon, dysenteric, and typhoid bacilli). On the whole, 73.68% of the investigated strains were lysogenic.

RECHERCHES SUR LE VIRUS *COXSACKIE*

IV. CONSIDÉRATIONS ÉPIDÉMIOLOGIQUES (1953—1957)

par

C. Ionesco-Mihăieşti, R. Klein, F. Horodniceanu, M. Marcovici et Elena Buimovici

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de la Poliomyélite)

— Manuscrit reçu le 1 décembre 1959 —

Les infections provoquées par le virus Coxsackie ont constitué, en Roumanie, l'objet de nombreux travaux, ayant pour but de préciser quelques données relatives à la biologie de ce virus (8,19), ses relations avec la poliomyélite (7, 11, 15, 20), ainsi que les aspects particuliers de certains foyers épidémiques (4, 9, 21). L'identification sérologique des types de virus rencontrés en Roumanie (5, 10) nous permet de tirer certaines conclusions en ce qui concerne:

(*a*) La fréquence des différents types antigéniques de virus Coxsackie et leur distribution régionale et annuelle en Roumanie; (*b*) les relations entre le type de virus isolé et la forme clinique de la maladie; (*c*) les particularités épidémiques de certains foyers.

Le matériel et les techniques utilisées pour l'isolement des souches de virus Coxsackie, ainsi que l'identification de leur type antigénique ont été décrits dans des communications antérieures (8,10).

I. *La fréquence des différents types antigéniques* entre 1953—1957, est présentée dans le tableau I.

Tableau I

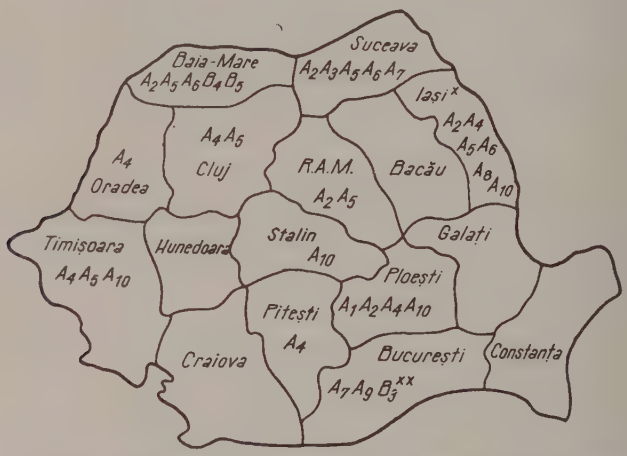
Virus Coxsackie isolés (1953—1957)
Distribution des types antigéniques

Année	Selles examinées	Virus isolés	Proportion %	Souches isolées par d'autres laboratoires	Types antigéniques															Total
					A_1	A_2	A_3	A_4	A_8	A_9	A_7	A_9	A_{10}	*) A?	B_3	P_4	P_5	Mixte		
1953	17	1	5,9	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		1
1954	138	7	5.1	—	1	1	—	—	—	—	—	—	2	3	—	—	—	—		7
1955	81	7	8,6	1	—	1	—	2	2	—	—	—	1	2	—	—	—	—		8
1956	446	16	3,8	—	—	1	—	4	2	4	—	—	—	—	—	1	4	—		16
1957	877	21	2,4	14	—	1	2	1	12	9	4	1	1	1	1	—	—	2		35
Total	1555	52	3,3	15	1	4	2	8	16	13	4	1	4	6	1	1	4	2		67

*) type non-identifié appartenant au groupe A.

En ce qui concerne les données réunies dans ce tableau, quelques précisions sont nécessaires: les 236 échantillons de selles dont on a isolé 15 souches de virus Coxsackie, de 1953 à 1955, n'ont été examinés que pour la recherche de ce virus (7, 8, 9); le virus a été isolé dans 6,35% des cas.

Des 446 échantillons examinés en 1956, 425 ont été examinés pour la présence du virus Coxsackie de même que pour celle du virus polio; on en a isolé



Carte No. I. — Distribution des types antigéniques de virus dans les différents départements de la Roumanie.

*) Les souches originaires du dép. de Iassy ont été isolées et identifiées par Duca (5) à l'exception d'une souche de type A_2.

**) La souche B_5 a été isolée à partir d'un mélange de selles sans pouvoir être retrouvée dans aucun des échantillons individuels. Elle n'apparaît pas dans les considérations qui suivent.

6 souches de virus Coxsackie, c'est-à-dire une proportion de 1,41% (15). Des 21 épreuves examinées, seulement pour la présence du virus Coxsackie, on a isolé 10 souches (47,5%). En 1957, 877 échantillons ont été examinés simultanément pour la présence des deux virus (Coxsackie et polio) 21 souches de virus Coxsackie étant isolées, une proportion donc de 2,39% (11). Parmi les autres 14 souches identifiées, 12 avaient été isolées par Topciu (20) et 2 par le Dr. R. Roth (Hôpital Emilia Irza de Bucarest).

Les chiffres indiqués dans ce tableau bien qu'insuffisants pour nous permettre une interprétation statistique, montrent que, en général, pendant la période étudiée, on a rencontré tous les types de virus, à l'exception des virus du groupe B, isolés seulement en 1956 et des types A_3 et A_7, isolés exclusivement en 1957.

II. *Distribution territoriale des types antigéniques* de virus. Nous avons isolé des virus Coxsackie dans 11 des 16 départements du pays. La distribution des types antigéniques dans ces départements est figurée dans la carte Nr. I.

La fréquence de chacun des types antigéniques de virus, par département, est présentée dans le tableau II.

Tableau II

La fréquence des types antigéniques de virus dans les différentes régions du pays

Département	Types antigéniques													Total
	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	A_7	A_9	A_{10}	A?	B_4	B_5	Mixte	
Bucarest	—	—	—	—	—	—	3	1	—	—	—	—	—	4
Timişoara	—	—	—	2	11	—	—	—	1	—	—	—	1	15
Baia-Mare, Oradea	—	1	—	1	1	8	—	—	—	1	1	4	—	17
Suceava, Iassy . .	—	2	2	—	2	5	1	—	—	1	—	—	—	13
Cluj, R.A.M. . . .	—	—	—	2	2	—	—	—	—	1	—	—	1	6
Ploieşti, Staline Piteşti	1	1	—	3	—	—	—	—	3	3	—	—	—	11

Afin d'obtenir une image d'ensemble plus synthétique nous avons dans certains cas groupé 2 ou 3 départements limitrophes.

L'analyse de la carte No. I et du tableau II permet de constater que les types A_2 et A_4 sont les plus répandus, étant isolés dans 6 départements. Le type A_5, bien que présent dans 5 régions a été rencontré plus souvent dans le dép. de Timişoara que dans les autres régions. Le type A_3 n'apparaît que dans le dép. de Suceava, A_6 dans les dép. de Baia-Mare et de Suceava, A_7 dans les dép. de Bucarest et de Suceava, A_{10} dans les dép. de Iassy (4), Ploieşti et Staline. Les virus du groupe B n'ont été isolés que dans le district de Carei (dép. Baia-Mare) et dans le dép. de Bucarest.

En ce qui concerne la distribution annuelle des types de virus dans ces départements on observe (Tableau III) que les types A_2 et A_4, trouvés dans

Tableau III

Distribution des types antigéniques de virus dans les différentes régions (1953—1957) *)

Année	Départements					
	Bucarest	Timişoara	Cluj RAM,***)	Baia-Mare Oradea	Suceava Iassy	Ploieşti Staline Piteşti
1953	—	—	—	A_4	—	—
1954	—	—	—	—	A_2	$A_{10}A_1$
1955	—	A_5	A_4A_5	A_2	—	A_{10}
1956	—	A_4	A_5	$A_6B_5B_4$	A_{10}**	A_4A_2
1957	A_7A_9	A_5A_{10}	A_5A_2	A_6	$A_6A_5A_3$	A_4

*) L'ordre des types dans le tableau correspond à leur fréquence.
**) Duca et coll. (4)
***) RAM = Région Autonome Maghiare.

6 départements, ont été isolés pendant toute la période 1953 à 1957. Le type A_5 se maintient dans les départements de Timişoara et de Cluj de 1955 à 1957, le type A_6 dans le département de Baia-Mare de 1956 à 1957. Le type A_{10}, isolé jusqu'en 1955 dans les départements de Ploieşti et de Staline, a représenté en 1956 à Iassy (4) presque la totalité des virus isolés. Pendant l'année 1957, le type A_7 a été isolé 3 fois à Bucarest et une fois à Suceava.

Malgré le nombre relativement restreint des souches étudiées on peut constater une certaine prévalence de l'un ou de l'autre des types antigéniques du virus dans les différentes régions, prévalence qui a varié avec l'année de l'isolement: A_5 dans le dép. de Timişoara en 1957, B_5 à Carei (dép. Baia-Mare) en 1956, A_6 à Satu-Mare (dép. Baia-Mare) en 1957, A_{10} dans le département de Iassy en 1956 (4) et A_7 à Bucarest en 1957.

III. *Relations entre le type antigénique et la forme clinique.* Sur 66 souches étudiées douze seulement proviennent de cas où les cliniciens avaient supposé une infection à virus Coxsackie: 8 souches isolées à partir de grippes estivales, une d'un cas d'herpangine, une d'un cas de myalgie, une autre d'un syndrôme Guillain-Barré et la dernière d'une méningite aseptique.

Les autres 52 souches proviennent de cas de paralysies faciales et des extrémités, de méningites aseptiques ou des porteurs sains de leur entourage. On n'a jamais isolé simultanément ou consécutivement le virus Coxsackie et le virus polio chez des malades paralytiques.

La distribution des types antigéniques par rapport à la forme clinique de la maladie est présentée dans le tableau IV.

Tableau IV

Type antigénique des virus isolés par rapport à la forme clinique de la maladie

Forme clinique	Type antigénique													Total
	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	A_7	A_9	A_{10}	A?	B_4	B_5	Mixte	
Parèses et paralysies des extrémités .	1	1	—	6	10	3	2	—	1	4	—	—	—	28
Parèses et paralysies faciales.	—	2	2	—	—	3	—	—	—	—	—	—	1	8
Méningites aseptiques	—	—	—	—	2	2	—	1	—	—	—	—	—	5
Maladies diagnostiquées comme infection à virus Coxsackie . . .	—	1	—	—	2	3	2	—	—	—	—	4	—	12
Porteurs sains . .	—	—	—	2	2	2	—	—	3	2	1	—	1	13

Les données du tableau IV nous permettent de constater: *(a)* presque tous les types du groupe A ont été isolés des cas de parèses et de paralysies des extrémités, mais on n'a jamais isolé un virus du groupe B. *(b)* Six des huit souches de type A_4 et dix des seize souches de type A_5 ont été isolées de parèses ou de paralysies des extrémités, donc la majorité des souches de ces types. *(c)* Les souches de type A_3 ont été trouvées seulement chez des malades atteints de paralysie faciale. A Satu-Mare (dép. Baia-Mare) on a isolé en 1957, de trois cas de paralysie faciale 3 souches de virus Coxsackie de type A_6. *(d)* Toutes les souches de type B_5 de même que 3 des souches de type A_6 ont été isolées des cas de grippes estivales; ces virus ont été isolés dans le même foyer. *(e)* La seule souche de type A_9 isolée a été rencontrée dans un cas de méningite aseptique. *(f)* Les souches de type A_6 ont été trouvées dans toutes les formes de maladies décrites, mais avec une fréquence relativement réduite dans les parèses et les paralysies des extrémités.

(g) La proportion des différents types isolés des porteurs sains est en rapport direct avec la fréquence générale du type respectif.

IV. *Particularités des foyers étudiés.* Les foyers dont proviennent les virus Coxsackie étudiés, ont été décrits dans des communications antérieures (7, 8, 9, 15, 20), exceptant le foyer de Carei et en partie celui du dép. de Suceava (21).

1. Vers la fin du mois de juin 1956, une épidémie de grippe estivale a éclaté dans la ville de Carei (dép. de Baia Mare), parmi les enfants au-dessous de 10 ans. Pendant la première semaine de juillet 1956, 21 échantillons de selles ont été prélevés, permettant l'isolement de 10 souches de virus Coxsackie: 8 souches provenant des malades (4 de type B_5, 3 de type A_6 et une de type A_5) et deux des porteurs sains (1 de type A_6 et l'autre de type B_4) *

En même temps que l'épidémie de Carei, un nombre important de cas similaires a été enregistré dans le district de Tăşnad. Parallèlement avec cette épidémie de grippe estivale de Carei et de Tăşnad, une épidémie massive de poliomyélite évoluait dans les autres districts du dép. de Baia Mare. Le nombre des cas de poliomyélite apparus entre 1953—1956 dans le département de Baia Mare est exposé dans le tableau V.

Tableau V

Nombre des cas de poliomyélite dans les districts du département Baia-Mare (1953—1956)

Districts	Année			
	1953	1954	1955	1956
Carei	1	9	10	18
Tăşnad	2	2	—	6
Satu-Mare	6	5	10	150
Cehul Silvaniei	—	2	3	53
Baia-Mare	12	7	18	99
Oaş	8	4	8	31
Sighet	—	—	16	14
Lăpuş	12	4	—	11
Vişeu	1	—	5	4
Total département	42	33	70	386

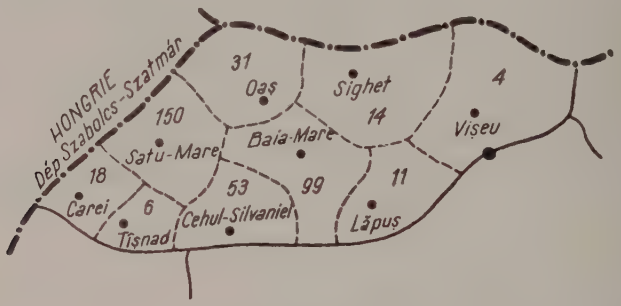
Ces chiffres montrent que la morbidité par poliomyélite dans le département de Baia-Mare s'est maintenue à un niveau assez bas jusqu'en 1955, pour augmenter brusquement en 1956 dans 4 districts situés à l'ouest du département (Satu-Mare, Oaş, Baia Mare et Cehul Silvaniei). Dans trois autres districts situés à l'est de la région épidémique (Sighet, Lăpuş et Vişeu) la morbidité reste toutefois pareille ou même inférieure à celle des années précédentes.

La carte No. II représente la disposition des districts de ce département Les trois districts de l'Est montagneux, occupent une position excentrique,

*) Nous tenons à remercier le Dr. Opriş de Carei, pour l'aide précieuse accordée au cours de ces investigations.

ayant peu de contact économique avec les régions voisines. Par contre, les districts de Carei et de Tășnad sont situés au milieu des districts à haute morbidité, avec lesquels les relations économiques sont relativement fréquentes.

Les données de *Rudnai* (18) concernant la poliomyélite en Hongrie sont particulièrement intéressantes pour caractériser la situation épidémiologique du territoire mentionné plus haut. Le département Szabolcs-Szatmár de Hongrie, limitrophe au département de Baia-Mare, présente au cours de la même année



Carte No. II. — Nombre des cas de poliomyélite dans les districts du département Baia-Mare (en 1956)

la morbidité la plus élevée par poliomyélite observée sur tout le territoire hongrois (47,9‰). D'ailleurs, pendant toute la période comprise entre 1953 — 1956 la morbidité par la poliomyélite dans le département de Szabolcs-Szatmár a été similaire à celle du département de Baia-Mare et, dans certains districts, notamment dans ceux situés à la frontière même, elle a parfois dépassé 100‰ (voir tableau VI).

Tableau VI

Morbidité par poliomyélite entre 1953—1956 dans les départements de Szabolcs-Szatmár et Baia-Mare

Département	Année			
	1953	1954	1955	1956
Szabolcs-Szatmár (Hongrie) (18) .	2,7	19,5	6,1	47,9
Baia-Mare (Roumanie)	5,9	4,6	9,8	54,1

L'impression qui se détache de ces observations est que l'épidémie de grippe estivale aurait empêché probablement dans les districts de Carei et de Tășnad, la dissémination de la poliomyélite existant dans les territoires avoisinés, par un phénomène d'interférence épidémiologique.

2. Wisner et coll. (21) ont décrit l'épidémie de poliomyélite apparue en 1957 dans le département de Suceava, signalant que dans certains districts (Botoșani, Trusești et Săveni) les virus polio isolés dominaient nettement par rapport au nombre des virus Coxsackie, plus réduit, tandis que dans d'autres (Fălticeni et Gura Humorului) la situation était inverse. Le district de Suceava occupait une position intermédiaire. Les virus polio isolés appartenaient au type I, le

type des virus Coxsackie n'ayant pas été déterminé par les auteurs. L'identification ultérieure de ces souches (10) nous permet aujourd'hui de dresser la carte de la répartition des types de virus Coxsackie dans ce département (voir carte No. III).

Carte No. III. — Distribution des types antigéniques de v. Coxsackie et Polio dans les districts du département Suceava en 1957.

Cinq des 11 souches de v. Coxsackie isolées dans cette région appartenaient au type A_6, les autres étant de type A_2, A_3, A_5 ou A_7. Une souche de groupe A est restée non-identifiée.

Le grand nombre des types antigéniques, leur distribution et la variété des formes cliniques dont ils provenaient (6 souches de cas de parèses ou paralysies des extrémités, 3 souches de paralysies faciales et 3 souches de méningites aseptiques) ne nous permettent pas de parler d'une épidémie à virus Coxsackie proprement dite. Les auteurs du travail cité (21), considèrent toutefois que dans ce cas *également*, l'absence du virus polio dans les districts mentionnés serait due à un phénomène d'interférence épidémiologique.

DISCUSSIONS

1. La proportion peu élevée des souches de virus Coxsackie isolées est certainement due au fait que nos recherches avaient comme objet surtout des cas de paralysie signalés par les cliniciens. Chez 30,3% de ces cas nous avons isolé, en 1956, des virus polio, tandis que le virus Coxsackie n'a été trouvé que chez 1,8% des mêmes cas (15). Là où le virus Coxsackie semblait jouer un rôle étiologique, la fréquence des souches isolées est beaucoup plus importante: à Carei, par exemple, la proportion des isolements s'élevait à 47,5%, Duca, en Moldavie, les a isolés en 35% des cas examinés. (4). Ces données concordent avec celles de Johnsson, qui n'a réussi a isoler le virus Coxsackie que chez 0,9% des cas de paralysies examinés (13), tandis que pendant les épidémies de Coxsackie la proportion des résultats positifs a été de 35% (12).

2. L'étude des caractères antigéniques des souches isolées — effectuée pour le groupe A exclusivement à l'aide des sérums A_1—A_{10}—a montré que ce groupe est représenté en Roumanie par tous ces 10 types (5,10). L'isolement

de certaines souches appartenant au groupe A, non-identifiées à l'aide des sérums A_1—A_{10} et dépourvues d'action cytopathogène, permet de supposer également la présence d'au moins un des types A_{12}, A_{14}, A_{16} ou A_{19} (10). Le groupe B a été représenté par un nombre relativement restreint de souches et seulement par les types B_3, B_4 et B_5. Ces données concordent avec les résultats publiés par d'autres auteurs, selon lesquels, lorsqu'on étudie les types de virus Coxsackie durant une période prolongée sur le territoire d'un pays — Johnsson en Suède (14), Yokota au Japon (22) et de Goes et coll., au Brésil (6) — on parvient à découvrir tous les types antigéniques du virus.

3. Le fait de ne pas avoir isolé chez les malades paralytiques que des souches du groupe A et jamais des souches B, concorde avec les données réunies par Dalldorf (3): à partir de 282 échantillons de matières fécales provenues de cas de paralysies et de 202 qui provenaient de cas non-paralytiques, on a isolé 54, respectivement 51 souches de virus Coxsackie; les 54 souches isolées des cas de paralysie appartenaient toutes au groupe A, tandis que des 51 souches isolées des cas non-paralytiques, seulement 22 faisaient partie du groupe A , les autres 29 appartenant au groupe B.

Bien que dans les cas de paralysie positifs pour le virus Coxsackie nous n'ayons jamais rencontré en même temps le virus polio, le rôle étiologique du premier ne peut être considéré comme certain, étant donné que les méthodes utilisées pour l'isolement du virus polio, ne sont pas toujours suffisamment sensibles (cellules HeLa) ou bien que le prélèvement des selles ait été fait à un moment où le malade n'éliminait pas ce virus.

Les données de Choumakov et coll. (1) ont montré, toutefois, que le virus Coxsackie A_7 peut déterminer un tableau clinique et même des lésions histologiques pareilles à celles de la poliomyélite, de sorte qu'il n'est guère exclu que des maladies paralytiques graves (irréversibles ou mortelles) soient dues également à d'autres virus du groupe A. D'ailleurs l'isolement d'un virus du groupe A chez des malades paralytiques a été maintes fois signalé dans la littérature.

4. Des recherches plus anciennes ont montré l'existence d'une interférence entre le virus polio et le virus Coxsackie du groupe B, observée aussi bien en cultures de tissus (16) que sur la souris (2). Les données de Dalldorf (3) concernant certains cas d'interférence épidémiologique entre le virus polio et le virus Coxsackie montrent que, ici également, seuls les virus du groupe B jouent un rôle actif. Il semble donc justifié de supposer que l'extension de la poliomyélite dans le district de Carei aurait été empêchée par un phénomène d'interférence épidémiologique, semblable à celui signalé par Melnick (18) au Texas. La situation est cependant différente pour la région de Suceava, où on n'a isolé que des virus de groupe A (21).

RÉSUMÉ

1. On étudie la distribution sur le territoire de la Roumanie des types du virus Coxsackie isolés entre les années 1953—1957. Les 67 souches isolées dans 11 départements du pays appartenaient au types A_1—A_{10} et B_3—B_5, avec prévalence occasionnelle régionale ou annuelle de certains de ces types.

2. Des 66 souches de virus Coxsackie, 28 ont été isolées à partir de cas présentant des paralysies aux extrémités, 8 de paralysies faciales, 5 des méningites aseptiques; 12 provenaient de cas où le diagnostic d'infection à virus Coxsackie avait été supposé avant l'isolement du virus; 13 souches provenaient

d'excréteurs sains. A signaler que toutes les souches provenues des cas paralytiques appartenaient au groupe A et que jamais on n'a constaté la présence simultanée d'un virus Coxsackie et d'un virus polio chez le même malade.

3. On décrit un foyer de grippe estivale à Carei, qui semble avoir empêché l'extension de la poliomyélite dans ce district, à l'époque où cette maladie était très répandue dans toutes les régions avoisinantes (morbidité $100^0/_{0000}$). Une situation à peu près semblable a été observée dans le département de Suceava

BIBLIOGRAPHIE

1. Choumakov M. P., Vorochilova M. K., Jevandrova M. I., Mironova L. L., Itzelis F. G. et Robinson I. A. — Vopr. Virusol. 1956. **1**, 16.
2. Dalldorf G. — J. Exp. Med. 1951, **94**, 65.
3. Dalldorf G. — Ann. Rev. Microbiol. 1955. **9**, 277.
4. Duca M., Duca E., Tomesco E., Oană C. et Boţan A. — Studii Cercet. Ştiinţ. Med. Acad. R.P.R. Iaşi. 1957, **8**, 279.
5. Duca M., Duca E., Tomesco E., Boţan A. et Băjenaru C. — Studii Cercet. Ştiinţ. Med. Acad. R.P.R. Iaşi. 1957. 8. 287.
6. de Goes P., Travassos J. et Vasconcellos J. V. — Anais Microbiol. 1958. **6**, 13.
7. Ionesco-Mihăieşti C., Horodniceanu F., Zamfiresco M., Klein R., Gancevici G., Steresco P. et Buşilă V. — Com. Acad. R.P.R. 1954, **4**, 537.
8. Ionesco-Mihăieşti C., Klein R., Horodniceanu F. et Zamfiresco M. — Studii Cercet. Inframicrobiol. Microbiol. Parazitol. 1955, **6**, 461.
9. Ionesco-Mihăieşti C., Klein R., Horodniceanu F., Sergiesco D. et Zamfiresco M. — Com. Ses. Ştiinţ. IMF Buc. 1956, p. 82.
10. Ionesco-Mihăieşti C., Sergiesco D., Buimovici E., Klein R., Zamfiresco M. et Horodniceanu F. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie 1959. **18**. 373.
11. Ionesco-Mihăieşti C., Wisner B., Buimovici E., Marcovici M., Băcanu C., Dona D., Zamfiresco M., Pleceaş P. et Moraru E. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie 1959 **18**. 485.
12. Johnsson T. — Arch. f. Ges. Virusforsch. 1954. **5**, 401.
13. Johnsson T. — Arch. f. Ges. Virusforsch. 1955. **6**, 250.
14. Johnsson T. — A virological and clinical study of infections with Coxsackie virus. Bohuslänningens A.B. Uddevalla 1955.
15. Klein R., Horodniceanu F., Sergiesco D., Marcovici M., Zamfiresco M. et Buimovici E. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie 1957. **16**. 457.
16. Ledinko N. et Melnick J. L. — J. Exp. Med. 1954. **100**, 247.
17. Melnick J. L. et Dow R. P. — Am J. Hyg. 1953. **58**, 288.
18. Rudnai O. — Acta Microbiol. Acad. Scient. Hung. 1958. **5**, 359.
19. Sergiesco D., Horodniceanu F., Klein R. et Zamfiresco M. — Studii Cercet. Inframicrobiol. Microbiol. Parazitol. 1955. **6**, 461.
20. Topciu V., Reichrath S., Kocsis T., Gutfreund A. et Frăsinel N. — Tim. Med. 1957. 2.
21. Wisner B., Marcovici M., Buimovici E., Zamfiresco M. et Buzdugan I. — Com. Conf. Polio. Vatra Dornei 1957.
22. Yokota T. — Virus 1956, **6**, 461

ИЗУЧЕНИЕ ВИРУСА КОКСЭКИ

IV. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (1953—1957)

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Изучали распределение на территории Румынии типов вируса Коксэки, выделенных между 1953-им и 1957-ым годом. 67 штаммов, выделенные в 11 областях страны принадлежали типам A_1—A_{10} и B_3—B_5, со случайным областным или годичным преобладанием некоторых из этих типов.

2. Среди 66 штаммов вируса Коксэки, 28 были выделены при заболеваниях с параличами конечностей, 8 при лицевых параличах, 5 при асептических менингитах; 12 происходили от больных, у которых предполагали диагноз инфекции с вирусом Коксэки перед выделением вируса; 13 штаммов происходили от здоровых носителей. Необходимо отметить, что все штаммы, происходящие от больных с параличами, принадлежали к группе А и что никогда не отмечалось одновременное наличие вируса Коксэки и вируса полиомиэлита у одного и того же больного.

3. Описывается очаг летнего гриппа в Кареи, воспрепятствовавший повидимому распространению гриппа в этом районе, окруженном территориями, где в то же время полиомиэлит имел большое распространение (заболеваемость 100 %/0000). Почти такое же положение отмечено в области Сучава.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS COXSACKIEVIRUS.

IV. EPIDEMIOLOGISCHE BETRACHTUNGEN

(1953—1957)

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Verbreitung der von 1953 bis 1957 isolierten Typen des Coxsackievirus auf dem Gebiet der R.V.R. wird einer Betrachtung unterzogen. Die 67, in 11 Bezirken des Landes isolierten Stämme gehörten den Typen A_1 - A_{10} und B_3 - B_5 an, bei gelegentlichem Vorherrschen eines Typus in einem bestimmten Gebiet oder während eines Jahres.

2. Von 66 Coxsackievirusstämmen, wurden 28 von Fällen isoliert die Lähmungen der Extremitäten aufwiesen, 8 von Facialislähmungen, 5 von aseptischen Meningitisfällen. Zwölf Stämme wurden von Fällen isoliert, bei welchen die Diagnose einer Coxsackievirusinfektion schon vor der Virusisolierung vermutet worden war. Dreizehn Stämme wurden von gesunden Ausscheidern isoliert. Bemerkenswert ist, dass alle von paralytischen Fällen isolierte Stämme der Gruppe A angehörten und dass niemals Coxsackie und Poliovirus beim selben Patienten angetroffen wurden.

3. Es wird ein Herd von Sommergrippe im Bezirk Carei beschrieben, der scheinbar die Ausbreitung der Poliomyelitis in diesem Bezirk verhindert hat, zu einer Zeit während der in allen umgebenden Gebieten die Kinderlähmung sehr verbreitet war (Morbidität 100 pro 100.000). Ein ungefähr ähnlicher Sachverhalt wurde im Bezirk Suceava beobachtet.

INVESTIGATIONS ON THE COXSACKIE VIRUS

IV. EPIDEMIOLOGICAL CONSIDERATIONS (1953-1957)

SUMMARY

1. The distribution of Coxsackie virus types isolated in 1953—1957 on the Roumanian territory is studied. The 67 strains isolated in 11 districts of the country belonged to types A_1—A_{10} and B_3—B_5, with the occasional prevalence of one type in a certain area or during a certain year.

2. Of 66 Coxsackie virus strains, 28 were isolated from cases displaying paralysis of the limbs, 8 from cases of facial paralysis, 5 from cases of aseptic meningitis. Twelve strains were isolated from cases in which a tentative diagnosis of Coxsackie virus infection had been made before the isolation of the virus, and 13 from healthy excretors. It is noteworthy that all strains isolated from paralytic cases belonged to group A and that Coxsackie and polioviruses were never found to coexist in the same patient.

3. A hearth of summer influenza is described in the district of Carei, which appears to have prevented the spreading of poliomyelitis in this district at a time when the latter disease was of frequent occurrence in all surrounding areas (morbidity rate 100 per 100,000). An approximately similar situation was observed to prevail in the district of Suceava.

RECHERCHES BIOLOGIQUES, CHIMIQUES ET IMMUNO-CHIMIQUES SUR LE SÉRUM ANTI-PERTUSSIS

Note I. PRÉPARATION DU SÉRUM ANTI-PERTUSSIS DE CHÈVRE

par

VIORICA ANDREESCO et HENRIETTE VAINER

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Services de B. Pertussis et d'Immuno-Chimie)

— Manuscrit reçu le 22 mai 1959 —

Dans le traitement actuel de la coqueluche, chez le nouveau-né et l'enfant en bas âge, on utilise avec de bons résultats, les sérums anti-pertussis et les gamma-globulines spécifiques (1, 2, 3, 4, 5); par conséquent, divers auteurs ont préparé des sérums immuns d'homme (6, 7, 8, 9, 10), de lapins (7), de cheval (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 24, 25) et de solutions de globulines spécifiques (27, 31, 32, 33).

Les résultats favorables obtenus par KLIMENKO (21), à la suite de l'emploi à fins thérapeutiques des sérums immuns préparés sur chèvre, corroborés au fait constaté par nous que ce sérum est plus riche en gamma-globulines que le sérum d'autres espèces animales et qu'à la suite de son administration on évite à l'enfant la sensibilisation par les protéines de cheval, nous ont déterminé à préparer le sérum anti-pertussis sur chèvre.

Dans le présent travail, nous exposons les résultats de l'étude des propriétés biologiques de ce sérum.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Pour l'immunisation des chèvres, on a utilisé comme antigènes: des germes vivants de B. pertussis (G.B.P.) en cultures de 24 heures, provenant de souches lyophilisées de B. pertussis, phase I; l'endotoxine (Atg. 1 = Antigène 1) préparée selon la méthode Besredka et des « antigènes facilement diffusibles » en solution saline (NaCl 0,85%) (Antigène 2), (15, 21, 23). Le titrage des antigènes a été effectué par inoculations intradermiques aux cobayes (lésion dermo-nécrotique avec diamètre 1 cm = 1 unité toxique).

Les germes vivants ont été inoculés immédiatement après la préparation de la suspension; les antigènes 1 et 2 ont été administrés après leur mélange, en proportions égales le jour même de l'inoculation. (23).

L'immunisation des chèvres a été réalisée par des inoculations alternatives de germes vivants et antigènes extraits des germes, en doses progressives, et à des intervalles bien déterminés, conformément au schéma présenté dans le tableau I.

Tableau I

Le schéma d'immunisation des chèvres

Antigène			Dose administrée et voie d'inoculation
Mélange d'antigènes	A 8 jours d'intervalle		6 ml sous-cutanés
» »	» »	»	15 »
» »	» »	»	25 »
germes vivants	A 24 h. d'intervalle		5 unités d'opacité internationale (i/v) *)
» »	» »	»	10 unités d'opacité internationale (i/v)
» »	» »	»	15 unités d'opacité internationale (i/v)
mélange d'antigènes	A 8 jours	»	50 ml sous-cutanés
germes vivants	A 24 h.	»	15 unités d'opacité (i/v)
» »	» »	»	15 »
» »	» »	»	15 »
mélange d'antigènes	A 8 jours	»	100 ml sous-cutanés
germes vivants	A 24 h.	»	15 unités d'opacité (i/v)
» »	» »	»	20 »
» »	» »	»	25 »
mélange d'antigènes	A 8 jours	»	100 ml sous-cutanés
germes vivants	A 24 h.	»	15 unités d'opacité (i/v)
» »			20 »
» »			25 »
saignée après 10 et 20 jours			

*) 1 unité d'opacité internationale = 1 milliard germes (standard N.I.H.)

Le titrage des agglutinines a été fait d'après la méthode de Flossdorf (10).

Le titrage du pouvoir neutralisant a été effectué sur souris blanches (14—16 gr), inoculées par voie intracérébrale LD_{50}, étant calculé selon Reed et Muench (30).

Le titrage du pouvoir protecteur a été établi sur des souris (12 gr) inoculées par voie intramusculaire, avec du sérum total ou avec des fractions protéiques et infectées ultérieurement avec des aérosols de B. pertussis (pulvérisés pendant 1 heure à une pression d'une 1/2 atmosphère).

Les analyses chimiques ont été effectuées par dosages chimiques usuels et par chromatographie mono et bi-dimensionnelle (sur papier filtre) des matériaux, avant et après hydrolyse acide (avec HCl 6N et avec HCl 3N) (18). L'identification des composants amino-acides et carbohydrates a été faite après irrigation (sur papier Whatman No. 1), avec butanol-acétique-eau (4: 1: 5) (28), acétate d'étyl-pyridine-eau (2: 1: 2) et phénol —NH_4OH) et développement avec ninhydrine en solution chloroforme-collidine (18); réactif avec benzédrine (17); phtalate acide d'aniline (28); urée chlorhydrique et nitrate d'argent ammoniacal (22).

Pour l'électrophorèse sur papier on a utilisé le tampon Médinal-Véronal pH 8,4 μ = = 0,05 et du papier Whatman No. 1 (appareil type Grassman et Hannig construit dans notre laboratoire).

La diffusion en gel a été faite selon la technique décrite par Ouchterlony (26) en milieu tamponé. (Tampon barbital pH 8.4 μ = 0,03). *L'immuno-électrophorèse* a été effectuée d'après la méthode de Grabar et Williams (15).

Les fractions protéiques des sérums normaux et immuns de chèvre ont été isolées par précipitation saline avec sulfate de Na (20) et par électrophorèse préparative sur papier filtre.

RÉSULTATS

Les titres agglutinants moyens des sérums et des fractions protéiques obtenus de ces sérums sont présentés dans le tableau II.

La gamma-globuline immune présente des titres agglutinants moyens entre 51.200 et 102.400, le titre maximum étant 170.000; ils représentent le

double du titre du sérum total immun, tandis que ceux des alpha et bêta-globulines, ainsi que des albumines du sérum immun, sont identiques aux titres du sérum normal et au titres des globulines et albumines, isolées de ce dernier (par ex. 100, 200, 400).

Tableau II

Titres agglutinants (valeurs moyennes) des sérums totaux et des fractions protéiques isolées de ces sérums

Sérum ou fraction séro-protéique	Titre agglutinant *)
sérum immun total	25.600— 51.200
gamma-globuline du sérum immun	51.200—102.400
alpha-globuline du sérum immun	100—200
bêta-globuline du sérum immun	200—400
albumine du sérum immun	100—200
sérum normal total	200—400
gamma-globuline du sérum normal	200—400
albumine du sérum normal	0—100

*) Les chiffres représentent la réciproque des dilutions qui donnent une agglutination positive.

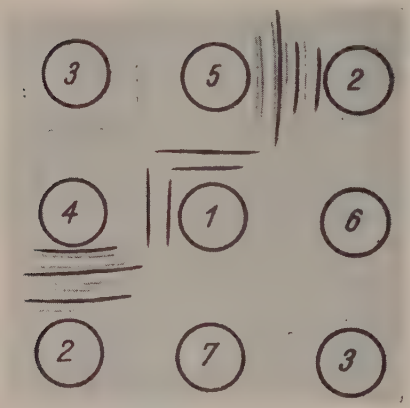
L'action neutralisante des sérums immuns de chèvre et de la gamma-globuline immune a été étudiée sur souris. Les souris inoculées par voie intracérébrale avec un mélange de sérums immuns ou de gamma-globulines immunes, ont résisté en proportion de 74—76%, en moyenne (tableau III).

Tableau III

Action neutralisante des sérums de chèvre et des fractions protéiques isolées de ces sérums

	Survivants %						
	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Exp. IV	Exp. V	Exp. VI	Moyenne
Sérum immun total	83	100	65	94	59	60	76,5
Gamma-globuline de sérum immun	83	91	68	81	71	50	74
Albumine du sérum immun	30	35	43	—	—	—	36
Sérum normal	32	0	10	42	7	10	16,5
Gamma-globuline du sérum normal	32	21	21	44	25	10	25,5
Albumine du sérum normal	16	30	21	—	—	—	22,3
DL_{50}	$28DL_{50}$	$26DL_{50}$	$19DL_{50}$	$18DL_{50}$	$20DL_{50}$	$25DL_{50}$	

Certaines expériences ont permis de constater une résistance des souris, allant jusqu'à 91—94% ou même 100%.



Photographie No. 1. — Réactions de précipitation (diffusion en gel) entre le sérum ou la gamma-globuline normaux et immuns et les antigènes utilisés pour l'immunisation (germes B. pertussis, Antigène 1 et Antigène 2):

1. Germes totaux B. pertussis
2. Antigène 1 (endotoxine Besredka)
3. Antigène 2 (antigène facilement diffusible)
4. Sérum immun total
5. Gamma-globuline immune
6. Sérum normal total
7. Gamma-globuline normale.

L'action neutralisante des sérums normaux de chèvre ou des fractions protéiques obtenues de ces sérums est de beaucoup plus réduite (25% des souris ont résisté).

L'action protectrice des sérums immuns est en moyenne la même que celle des gamma-globulines (76—80% des souris infectées résistent, tandis que les témoins, soumis à des conditions identiques, ont résisté en proportion de 21%) (tableau IV).

Le sérum normal de chèvre, l'albumine normale, ainsi que l'albumine immune ne protègent pas la souris, le pourcentage de la mortalité étant environ du même ordre que celui des témoins. La gamma-globuline normale confère aux animaux une résistance accrue (36%); elle est néanmoins deux fois inférieure à celle de la globuline immune.

Les réactions de précipitation par diffusion en gel (Photographie No. 1) ont mis en évidence, dans le sérum immun (SI (4)) et dans la gamma-globuline immune (GI (5)), les anticorps générés dans le sérum des animaux vis-à-vis: du germe total (1) — (par l'apparition de 2 lignes de précipitation); de l'endotoxine brute (2) — (8 lignes de précipitation, dont 3 plus intenses); de l'antigène 2 (3) — (1 ligne de précipitation d'intensité réduite).

Tableau IV

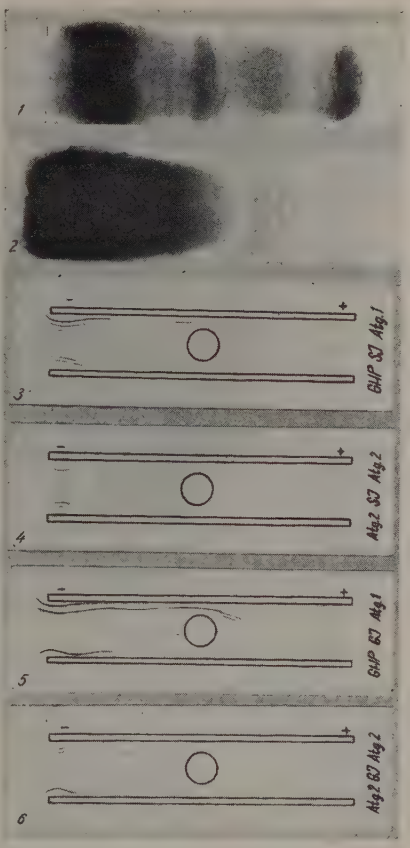
Action protectrice des sérums de chèvre et des fractions protéiques isolées de ces sérums

	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Moyenne des résultats
Sérum immun total	75%	85%	80%	80%
Gamma-globuline du sérum immun	70%	75%	85%	76%
Albumine du sérum immun	15%	25%	10%	16%
Sérum normal total	15%	30%	5%	16%
Gamma-globuline du sérum normal	40%	35%	35%	36%
Albumine du sérum normal	25%	10%	5%	13%
Témoins	25%	15%	25%	21%

Le contrôle immuno-électrophorétique a permis la localisation des anticorps générés dans le sang des animaux au cours de la préparation du sérum immun

(Photographie No. 2), respectivement: dans la réaction entre le sérum immun, ou la globuline immune et le germe total et l'antigène 2, apparaissent 2 lignes de précipitation, variant comme intensité et ayant la position des gamma-globulines sériques. L'antigène 1 réagit tant avec le sérum total qu'avec la globuline, présentant aussi des lignes de précipitation dans la région des bêta-globulines sériques.

L'analyse chimique, les examens chromatographiques et électrophorétiques, concernant la nature et la composition des antigènes bruts, employés pour l'immunisation, ont conduit aux résultats exposés dans le tableau V et les photographies Nos. 3 et 4.



Photographie No. 2. — Immuno-électrophorèse du sérum immun et des gamma-globulines immunes et des antigènes utilisés à leur préparation (germes B. pertussis, Antigène 1, Antigène 2).

1. Electrophorèse sur papier du sérum immun
2. Electrophorèse sur papier de la gamma-globuline immune
3. Electrophorèse en gel du sérum immun (SI) et diffusion des germes B. pertussis (GBP) et de l'antigène 1 (Atg. 1)
4. Electrophorèse en gel du sérum immun (SI) et diffusion de l'antigène 2 (Atg. 2)
5. Electrophorèse en gel de la gamma-globuline immune (GI) et diffusion des germes B. pertussis (GBP) et de l'antigène 1 (Atg. 1).
6. Electrophorèse en gel de la gamma-globuline immune (GI) et diffusion de l'antigène 2 (Atg. 2).

Tableau V

Le contrôle chimique des antigènes utilisés à la préparation du sérum immun

	Toxine (Atg. 1)	Composante diffusible (Atg. 2)
Résidu total mg/ml	20,70	16,65
Résidu organique mg/ml	11,52	7,77
Résidu minéral mg/ml	9,18	8,88
Azote total (+) % mg rés. org.	24,30	19,30
Azote non-protéique (+) % mg rés. org.	10,40	13,31
Azote protéique (+) mg/ml	8,60	5,90
Azote polypeptidique (+) % mg res. org.	1,70	7,06
Azote aminique (++) mg/ml.	2,00	2,40
Substances réductrices libérées par hydrolyse (+++)	5,03	31,01

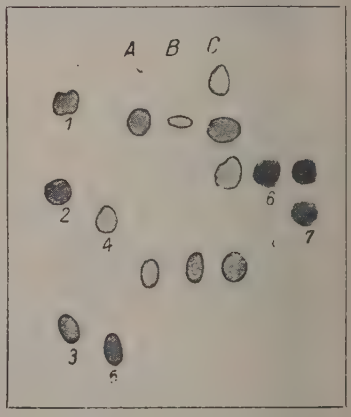
Légende: (+) = Méthode Microkjeldahl
(++) = Méthode Pope Stevens (29)
(+++) = Méthode Hagedorn-Jensen

Réactions qualitatives			Atg. 2 dialysé 24 heures	Atg. 2 dialysé 72 heures
Réaction du Biuret	++	+	±	±
Réaction Millon	++	++	++	±
Réaction Molish	+	+++	+++	+++
Réaction Xanthoprotéique	++	+	+	±
Réaction pour lipides [1])	±	++	—	—

[1]) Réaction au Sudan Black B.

Photographie No. 3. — Chromatogramme des amino-acides présents dans les hydrolysats acides des composants antigéniques, utilisés à la préparation du sérum immun:

A = Hydrolysat acide de la suspension de B. pertussis
B = Hydrolysat acide de la solution d'antigène 1
C = Hydrolysat acide de la solution d'antigène 2
1—16 Témoins (amino-acides purs):
1. Cystine
2. Acide glutamique
3. Alanine
4. Leucine
5. Lysine
6. Glycocolle
7. Thréonine
8. Phénil-alanine
9. Histidine
10. Arginine
11. Proline
12. Méthionine
13. Sérine
14. Acide aspartique
15. Tyrosine
16. Valine.



Photographie No. 4. — Chromatogramme des carbohydrates présents dans les hydrolysats acides des composants antigéniques utilisés à la préparation du sérum immun.

A = Hydrolysat acide de la suspension de germes B. pertussis
B = Hydrolysat acide de la solution Antigène 1
C = Hydrolysat acide de la solution Antigène 2
1—7 Témoins (carbohydrates purs):
1. Glucosamine
2. Glucose
3. Acide glycuronique
4. Rhamnose
5. Fructose
6. Galactose
7. Manose.

CONCLUSIONS

Nous présentons dans ce travail la méthode de préparation d'un sérum mixte anti-pertussis de chèvre, ainsi que les propriétés biologiques des sérums normaux, immuns et des fractions protéiques isolées de ces sérums (alpha,-bêta et gamma-globulines et albumines).

Les immunisations ont été effectuées alternativement avec des mélanges d'antigènes extraits des germes (toxine et antigènes facilement diffusibles) et avec des germes vivants.

L'examen chimique préliminaire des antigènes utilisés a montré que la toxine brute est constituée de substances azotées (protéiques et non-protéiques) et d'un pourcentage réduit de carbohydrates.

Les antigènes facilement diffusibles contiennent des quantités plus petites de substances azotées et un pourcentage relativement élevé de carbohydrates (libres et polysaccharides). Les polysaccharides sont formés de glucosamine, galactose, glucose et probablement d'acide galacturonique.

Les réactions de précipitation en gel (diffusion et immuno-électrophorèse) ont mis en évidence, dans les sérums immuns et dans la gamma-globuline immune, la présence d'anticorps précipitants vis-à-vis du germe total, ainsi que vis-à-vis des antigènes 1 et 2, utilisés pour la préparation du sérum immun. En ce qui concerne la localisation des anticorps, l'immuno-électrophorèse a montré que ces derniers se trouvent localisés, par rapport au germe total et à l'antigène facilement diffusible (Atg. 2), dans la fraction gamma-globuline, alors que les anticorps vis-à-vis de l'endotoxine (Atg. 1) se trouvent dans les gamma et les bêta-globulines sériques.

Sur les immuno-sérums et les fractions protéiques isolées de ces derniers (gamma-globuline et albumine), on a titré: les agglutinines, les anticorps neutralisants et les anticorps protecteurs. Tous les titrages effectués ont été rapportés au sérum normal de chèvre et aux fractions protéiques, obtenues du sérum normal.

On a constaté que les sérums immuns de chèvre et la gamma-globuline immune, présentent:

a) des titres agglutinants variant entre 1: 25.600—1: 51.200 pour le sérum immun et de 1: 51.200—102.400 pour la gamma-globuline immune.

b) une action neutralisante moyenne de 74—76,5%.

c) une action protectrice moyenne de 76—80%.

Le sérum normal de chèvre, la gamma-globuline et l'albumine du sérum normal de chèvre, ainsi que l'albumine du sérum immun de chèvre, ne contiennent pas d'agglutinines anti B. pertussis et ne présentent pas de valeur protectrice, à l'exception de l'albumine du sérum immun qui montre une faible action neutralisante, fait qui pourrait s'expliquer par la présence des traces de globulines actives, dans la solution d'albumine.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bacon D. S. et Edelman J. — Biochem. J., 1951, **48**/1, 114.
2. Babaeva S. N. et Podolskaia A. A. — Jurn. mikrobiol., epidemiol. i immunobiol., 1956, No. 4, 7.
3. Bordet J. — Ann. Inst. Pasteur, 1910, **23**, 415.
4. Belozerski N. A. — Nauka i jizni 1955, **2**, 10. (cité par Babaeva et Podolskaia)
5. Cann J. R., Brown R. A. et Kinkwood J. G. — J. biol. chem., 1950, **185**, 663.
6. Chung K., Liu C. H. et Hsiang C. P. — Chin. Med. J., 1953, **5**, 371.

7. Cistovici Gn. — Jurn. mikrobiol., epidemiol. i immunobiol., 1956, No. 4, 17.
8. Debré R., Herzog F. et Guérin Y. C. — Arch. Franc. de Péd., 1951, **8**, 50.
9. Faur Y. — J. Microbiol., Parazitol., Epidemiol., 1957, **1**, 3.
10. Flossdorf E. V. — J. Pediatrics, 1941, **19**, 638.
11. Flossdorf E. V, Mc Guiness A. C. et Kimball A. — J. Pediatrics 1941, **19**, 638.
12. Frappier A. et Guérault A. — Rev. Canad. de Biol., 1954, **13**, 416; 1955 56, **14**, 193.
13. Frappier A. Gucrault A. et Repentigny J. — Compt. rend. 7th Intern. Congress Comparative Path. (Lausanne) **2**, 142.
14. Giraud P. Bernard R. et Salvini A. — Arch. de Péd., 1951, 8, 1.
15. Grabar P. et Williams C. A. — Biochem. Biophys. Acta, 1953, **10**, 193.
16. Hink J. et Johnson F. — J. Immunol., 1950, **64**, 39.
17. Horrocks A. R. — Nature 1949, **164**, 444.
18. Ionesco-Mihăieşti C., Dâmboviceanu A. et Vainer H. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie 1959 **18**, 323.
19. Jündell — Am. J. Dis. Children, 1935, **50**, 916.
20. Keckwick A. R. — Biochem. J., 1940, **34**, 1248.
21. Klimenko W. N. — Bull. Inst. Pasteur, 1912, **10**, 143.
22. Loiseleur J. — Techniques de laboratoire 1954, Ed. II Masson & Cie, Paris.
23. Magheru G., Faur Y., Ţigoiu V. et Ioanid H. — Ses. Ştiinţ. Inst. Cantacuzino, 1955.
24. Maitland H. B. et Guérault A. — J. of Path. and Bact., 1958, **76**, 257.
25. Mc Guiness A. G., Stokes J. et Mudd St. — J. Clin. Invest., 1937, **16** 185.
26. Ouchterlony O. — Acta Path. Microbiol. Scand., 1953, **32**, 231.
27. Palant B. L. et Himmelfaeb M. A. — L'efficacité du sérum immun anti-pertussis. Travaux de l'Inst. Ucrainien d'Epidémiol. et Microbiol. «Mecinicov», 1952, **19**. Ed. Méd. d'Etat de la R. S. S. Ucrainienne, Kiew.
28. Partridge M. S. — Nature, 1949, **164**, 443.
29. Pope C. G. et Stevens M. F. — Biochem. J., 1939, **33**, 1070.
30. Reed L. J. et Muench H. — Am. J. Hyg., 1938, **27**, 493.
31. Sedailland P., Bertoye A., Garin P. J., Gautier J., Megard M., Guillot M. et Najoux J. — Sem. des Hôpit., 1958, **14**/3, 142.
32. Soboleva D. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1947, No. 5, 33.
33. Teisseir R., Reilly J., Rivalier E. et Chambesedes H. — J. Phys. et Pathol. Gén., 1929, **27**, 549.

ХИМИЧЕСКОЕ, ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ И БИОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ КОЗЬЕЙ ПРОТИВОКОКЛЮШНОЙ СЫВОРОТКИ

Сообщение 1-*ое*. ИЗГОТОВЛЕНИЕ КОЗЬЕЙ ПРОТИВОКОКЛЮШНОЙ СЫВОРОТКИ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Описаны методики изготовления козьей иммунной смешанной противококлюшной сыворотки и биологические свойства данной сыворотки. Для изготовления иммунной сыворотки служили в качестве антигенов: живые коклюшные палочки I-й фазы, эндотоксин по Бесредка и антигены легко диффундирующие в физиологическом растворе. Схема иммунизации детально описана в статье.

Из иммунных и нормальных сывороток выделены гамма-глобулины (путем метода Кекуик с SO_4Na_2) и альбумины (путем высаливания с $SO_4(NH_4)_2$. Также, выделены при помощи электрофореза альбумин и глобулины альфа, бета и гамма (детали применяемых методик изложены во II-ом сообщении).

В нативной иммунной и нормальной сыворотке и во всех выделенных фракциях титровали агглютинины, нейтрализующее действие, защитное действие.

Полученные результаты показали, что иммунная сыворотка обладает агглютинирующими титрами колеблющимися между 1/25.800—1/51.200, в то время как гамма-глобулин обладает титром в 1/120.000, нейтрализующим действием в 74-76% и защитным действием числящим 76—80%.

Нормальная сыворотка, нормальные альфа, бета и гамма-глобулины, также как и альфа и бета глобулины иммунной сыворотки не содержат агглютининов и не обладают защитными свойствами. Только альбумин иммунной сыворотки проявляет слабое нейтрализующее действие.

Анализировались также, при помощи химических и хроматографических методов, антигены, служившие для иммунизации:, установлено, что применяемые антигены отли-

чаются друг от друга содержанием восстановительных веществ, являющимся в 6 раз больше в антигене, вытянутом при помощи физиологического раствора.

Диффузия в геле выполнялась с цельными иммунными и нормальными сыворотками и с выделенными из них гамма-глобулинами;, в качестве антигенов применялся эндотоксин по Бесредка, легко диффундирующий антиген, также как и цельный микроб. Из полученных результатов следует, что как цельная сыворотка, так и гамма-глобулин реагируют со всеми 3-мя антигенами, отличаясь только числом линий преципитации.

При имунноэлектрофоретическом изучении тех же, вышеупомянутых компонентов, установлено что антитела против цельного микроба и против легко диффундирующего антигена локализуются в гамма- глобулинах, в то время как антитела против эндотоксина локализуются в гамма и бета глобулинах.

Совокупность полученных данных отражает целесообразность приготовления смешанной иммунной сыворотки, при описанных условиях.

CHEMISCHE, IMMUNCHEMISCHE UND BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER ANTIPERTUSSIS-ZIEGENSERUM

1-te Mitteilung. DIE HERSTELLUNG VON ANTIPERTUSSIS-ZIEGENSERUM

ZUSAMMENFASSUNG

Die Methodik der Herstellung eines Antipertussis-Mischserums durch die Immunisierung von Ziegen und dessen biologische Eigenschaften werden beschrieben. Als Antigene für die Serumherstellung wurden verwendet: lebende Keime von *B. pertussis* in Phase I, Endotoxin nach Besredka und in physiologische Kochsalzlösung leicht diffusible Antigene. Das Immunisierungsschema wird im Einzelnen wiedergegeben.

Aus Immun und Normalsera wurden die Gammaglobuline (durch Keckwick's Methode mit SO_4 Na_2) und die Albumine (durch Aussalzung mit SO_4 $(NH_4)_2$) isoliert. Ausserdem wurden die Albumine und Alpha-, Beta- und Gammaglobuline auch elektrophoretisch gewonnen. (Einzelheiten der Methodik werden in der zweiten Mitteilung angegeben).

Sowohl im Immun- als auch im Normalserum und in allen isolierten Serumfraktionen wurden der Agglutinintiter, die Neutralisationswirkung und die Schutzwirkung bestimmt.

Die erhaltenen Resultate ergaben, dass das Immunserum Agglutinintiter von 1/25.800—1/51.200 und das Gammaglobulin einen solchen von 1/120.000 aufwies; die Neutralisationswirkung betrug 74—76% und die Schutzwirkung 76—80%.

Normalserum, normale Alpha,- Beta- und Gammaglobuline und Albumine, sowie die Alpha und Betaglobuline und die Albumine des Immunserums enthalten keine Agglutinine und besitzen keine Schutzwirkung. Nur das Albumin des Immunserums weist eine schwache Neutralisationswirkung auf.

Auch die zur Immunisierung verwendeten Antigene wurden chemisch und chromatographisch untersucht. Es ergab sich, dass sich die beiden Antigene durch ihren Gehalt an reduzierenden Stoffen unterschieden, der im Falle des mit physiologischer Kochsalzlösung extrahierten Antigens 6 Mal höher war.

Immun- und Normalsera und die aus ihnen isolierten Gammaglobuline wurden durch die Agardiffusionsmethode geprüft, wobei als Antigene Besredka's Endotoxin und das leicht diffusible Antigen, sowie die Keime selbst verwendet wurden. Aus den erhaltenen Resultaten ergibt sich, dass sowohl Totalserum als auch Gammaglobulin mit den drei Antigenen reagieren und sich durch die Anzahl der Präzipitationslinien unterscheiden.

Durch immunoelektrophoretische Untersuchung der oben angegebenen Komponenten konnte festgestellt werden, dass die Antikörper gegen ganze Keime und gegen das leicht diffusible Antigen in den Gammaglobulinen und die Antikörper gegen das Endotoxin in den Gamma- und Betaglobulinen enthalten sind.

Aus der Gesamtheit der erhaltenen Daten geht die Nützlichkeit der Herstellung von Mischimmunsera unter den angegebenen Bedingungen hervor.

A CHEMICAL, IMMUNOCHEMICAL, AND BIOLOGICAL STUDY OF ANTI-PERTUSSIS GOAT SERUM

1st Note. — PREPARATION OF ANTI-PERTUSSIS SERUM IN GOATS

SUMMARY

The methods used for the preparation of mixed anti-pertussis immune serum in goats and its biological properties are described. The antigens used for immunization were: living germs of *B. pertussis* in phase I, endotoxin of the Besredka type, and antigens readily

diffusing into physiologic saline. The details concerning the schedule of immunization are reported.

From immune and from normal sera gamma-globulins and albumins were isolated by Kekwick's method (with SO_4Na_2) and by salting out with $SO_4(NH_4)_2$, respectively. Albumins, alpha-, beta-, and gamma- globulins were also isolated electrophoretically (details of the techniques are reported in note 2).

In whole immune and normal serum as well as in all the fractions isolated, agglutinin titrations were carried out and the neutralizing and protecting actions were quantitatively determined.

The results obtained show that in immune sera agglutinin titres range from 1/25,800 to 1/51,200 while gamma-globulins display a titre of 1/120,000. The neutralizing action amounted to 74—76% and the protecting action to 76—80%.

Normal serum, normal alpha-, beta-, and gamma- globulins, normal albumin, as well as the alpha- and beta- globulins, and the albumin from immune sera do not contain agglutinins, and exert no protecting action. Albumin from immune sera displayed a low neutralizing power.

The antigens used for immunization were likewise analysed by chemical and chromatographical methods. The two antigens were found to differ by their contents of reducing substances, the amount of which is 6 times higher in the antigen extracted with physiological saline.

Diffusion tests in gels were performed with immune and normal sera and with the gamma-globulins isolated from them. Besredka's endotoxin and the readily diffusible antigen as well as whole germs were used as antigens. The results obtained show that whole serum as well as gamma-globulin react with the 3 antigens; the number of precipitation lines differs in each case.

An immuno-electrophoretical investigation of the above mentioned fractions showed that antibodies against the whole germ and against the readily diffusible antigen were contained in the gamma-globulins, while those against the endotoxin were contained in gamma- and beta-globulins.

On the whole, the data obtained demonstrate the utility of preparing mixed immune sera according to the above-described methods.

ÉTUDE CHIMIQUE, IMMUNO-CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DU SÉRUM ANTI-PERTUSSIS DE CHÈVRE

Note II. PRÉPARATION DE LA GAMMA-GLOBULINE ANTI-COQUELUCHEUSE.

par

HENRIETTE VAINER et VIORICA ANDREESCO

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Services d'Immuno-Chimie et de B. Pertussis)

— Manuscrit reçu le 22 mai 1959 —

Dans une note antérieure (6), nous avons exposé les résultats des recherches concernant la valeur immunologique des agglutinines et des anticorps neutralisants et protecteurs du sérum anti-pertussis, préparé sur chèvre.

La constatation des qualités biologiques du sérum immun de chèvre nous a déterminé à isoler, par fractionnement, ses composants protéiques et à étudier expérimentalement les propriétés des produits obtenus, en vue de leur application à des fins thérapeutiques. (2, 3, 7, 9, 21, 24, 26).

Nous exposons, dans la note présente, les méthodes utilisées pour le fractionnement des protéines des sérums de chèvre, qui nous ont permis d'obtenir une gamma-globuline 90% pure (contrôle électrophorétique) avec valeur protectrice, neutralisante et agglutinante satisfaisante, du point de vue expérimental.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les sérums normaux et immuns de chèvre, récoltés dans des conditions stériles, ont été filtrés (avant l'utilisation) par filtre Seitz E. K. (mélange de sérums provenant de 4 chèvres).

Les antigènes utilisés pour l'immunisation des chèvres, ont été: des germes vivants de B. pertussis phase I, de l'endotoxine (Antigène 1), préparée d'après la méthode de Besredka et un antigène facilement diffusible en solution saline (Antigène 2).

L'immunisation a été effectuée par des inoculations souscutanées et intraveineuses de suspensions de germes vivants, alternées avec le mélange des antigènes 1 et 2, selon la méthode décrite dans une note antérieure (6).

Le contenu en protéines totales a été déterminé par gravimétrie (13), multiplication par 6,25 de la valeur du N total (micro Kjeldahl) et par photo-colorimétrie au réactif Folin-Ciocîlteu (5).

L'électrophorèse sur papier a été effectuée à l'aide d'un appareil type Grassman et Hannig (10) construit dans notre laboratoire. Nous avons utilisé: du papier Whatman No. 1, No. 4 et Schleicher Schüll 2043 A, et un tampon médinal-véronal, pH 8,6 $\mu = 0,1$; pH 8,2 $\mu = 0,05$ et pH 8,4 $\mu = 0,079$, sous tension de 180—210 volts et intensité du courant de 0,3—0,5 mA/cm, pour un déplacement sur 9—10 cm de la ligne de départ du liquide, pendant 5 heures de migration à la température de 18—20°C.

La coloration des fractions, séparées par électrophorèse, a été faite pour les protéines avec Amidoschwartz 10 B (1) (pour les enregistrements photométriques directs avec un enregistreur Jouan), au bleu de bromphénol 0,1‰ (d'après Jenkes (16)) pour élution et photocolorimétrie (photocolorimètre soviétique FEK-M à filtre vert); avec Sudan III et Sudan black B, pour les lypoprotéines (4,8, 11): acide périodique et réactif Schiff (coloration PAS) pour les glycoprotéines (4, 18, 28).

L'hydrolyse acide effectuée pour l'étude de la composition en acides aminés a été faite avec un mélange hydrolysant contenant de l'acide chlorhydrique et de l'acide formique con-

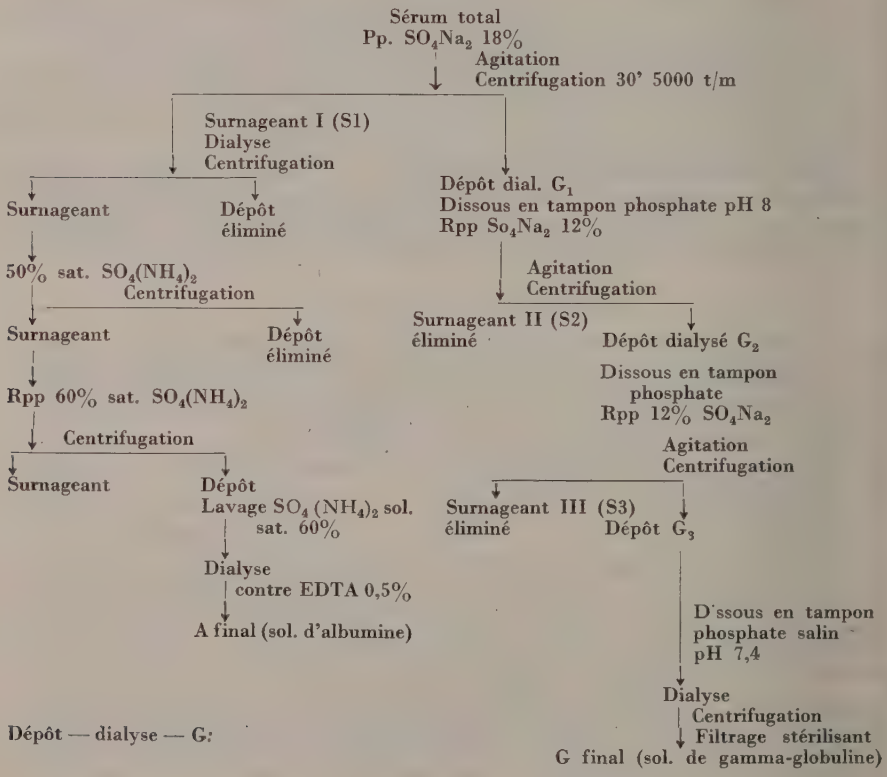
centré (14, 15). Après élimination de l'acide chlorhydrique, les hydrolysats ont été analysés par chromatographie sur papier. On a utilisé du papier Whatman No. 1, et Schleicher-Schüll 2043 A, du liquide d'irrigation Partridge (20) et du phénol/NH_4OH, le liquide révélateur étant une solution de ninhydrine en mélange chloroforme/collidine (14).

N'ayant pas trouvé dans la littérature des indications sur le fractionnement et la purification des protéines actives du sérum de chèvre, nous présentons les méthodes utilisées par nous: 1) fractionnement au sulfate de sodium d'après la technique décrite par Kekwick pour le sérum humain (17); 2) fractionnement au sulfate d'ammonium (19); 3) dialyse à +5°C et 4) électrophorèse sur papier (28).

A défaut des données bibliographiques, concernant les caractéristiques du sérum normal de chèvre, nous avons étudié certaines de ces propriétés (v. note p. 42). Les méthodes de fractionnement utilisées ont été appliquées, aussi bien au sérum normal, qu'au sérum immun.

ISOLEMENT DE LA GAMMA-GLOBULINE DU SÉRUM DE CHÈVRE PAR FRACTIONNEMENT AU SULFATE DE Na.

Schéma 1

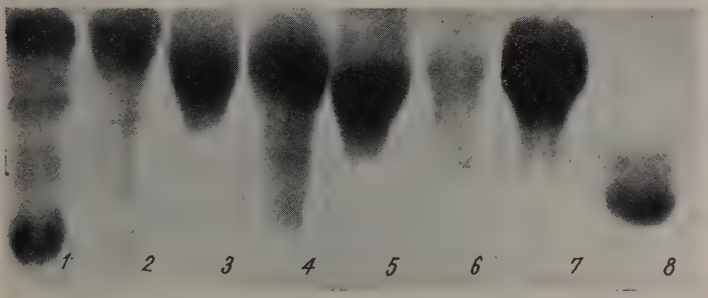


Fractionnement au sulfate de sodium. Des essais préalables, sur des petits lots de sérum normal et immun de chèvre, ont prouvé la possibilité d'appliquer cette technique, en obtenant une gamma-globuline qui, au contrôle électrophorétique sur papier présente une pureté de 80 – 90%. Les données concernant l'application de cette technique se trouvent résumées dans le schéma No. 1, la photographie No. 1 et le tableau I.

Les recherches effectuées à fin d'obtenir l'albumine cristallisée du sérum de chèvre (19) ont donné un produit cristallisé avec l'aspect microscopique de fines aiguilles, qui, même après trois cristallisations successives, a présenté, au contrôle électrophorétique, en plus de l'albumine, de faibles traces d'alpha-globulines.

Photographie No. 1

FRACTIONNEMENT AU SULFATE DE SODIUM DU SÉRUM DE CHÈVRE



1. sérum total
2. G I surnageant
3. G I dépôt
4. G II surnageant
5. G II dépôt
6. G III surnageant
7. G III dépôt
8. albumine (final)

Tableau I

Valeurs procentuelles des fractions protéiques pendant la purification avec sulfate de Na (analyse électrophorétique)

	Albumine	α 1 + α 2	β 1	β 2	γ-globuline
Sérum total	28,85	8,63	13,50	9,87	39,81
G I surnageant	2,05	2,31	5,01	6,98	89,11
G I dépôt	—	—	—	100	
G II surnageant	—	2,00	3,69	12,00	83,30
G III dépôt	—	—	—	100	
G III surnageant	—	—	—	(14,28)	(85,71)
Albumine	100	—	—	100	—

Fractionnement au sulfate d'ammonium. On a appliqué la même technique pour le sérum normal, que pour le sérum immun. Dans le schéma No. 2, photographie No. 2 et tableau II, sont représentés les résultats obtenus en observant les étapes de la purification au sulfate d'ammonium, ainsi que les images électrophorétiques et les résultats quantitatifs correspondants.

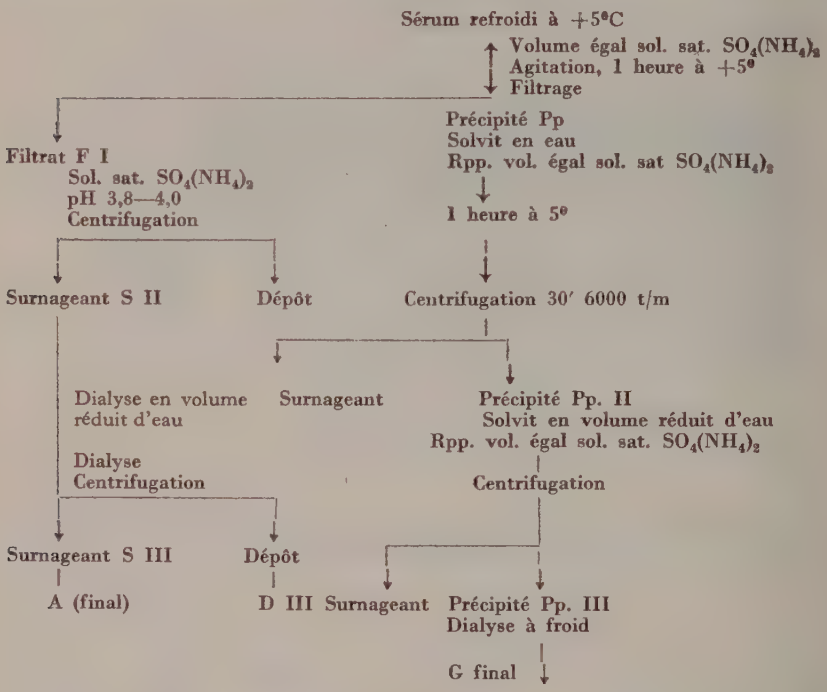
Fractionnement par dialyse. Le sérum normal, ainsi que le sérum immun anti-pertussis de chèvre, ont été soumis, pendant 72 heures, à une dialyse contre de l'eau bi-distillée, à +5°C (le rapport entre les volumes des liquides de l'intérieur et de l'extérieur du sac de dialyse (céllophane) étant de 1: 10 (schéma No. 3) (Photographie No. 3 et tableau III)

Fractionnement par électrophorèse (photographie No.4).

Dans les conditions de travail exposées dans la première partie de cette note, on a effectué l'électrophorèse des sérums de chèvre — normaux et immuns — en utilisant des bandes de papier 32/8 –16. Après identification des fractions respectives sur une petite portion du papier elles ont été éluées avec un tampon carbonate-bicarbonate salin, pH = 8,6 (26) et soumises au contrôle électrophorétique. Les éluats ont été dialysés pendant 24 heures contre de l'eau physiologique à +5°C, lyophilisés et gardés au froid. La photographie No. 4 présente les images électrophorétiques des fractions protéiques isolées par cette technique.

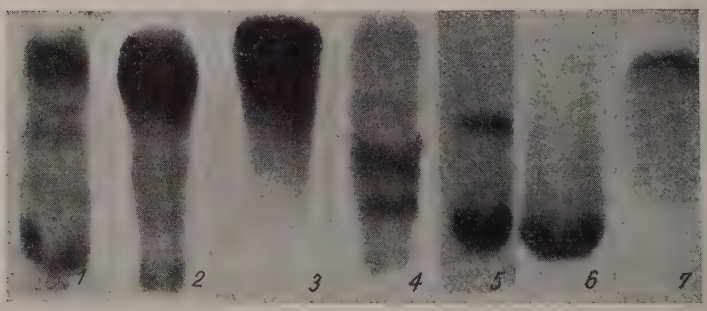
Schéma 2

ISOLEMENT DE LA GAMMA-GLOBULINE DU SÉRUM DE CHÈVRE PAR FRACTIONNEMENT AU SULFATE D'AMMONIUM



Photographie No. 2

FRACTIONNEMENT AU SULFATE D'AMMONIUM DU SÉRUM DE CHÈVRE



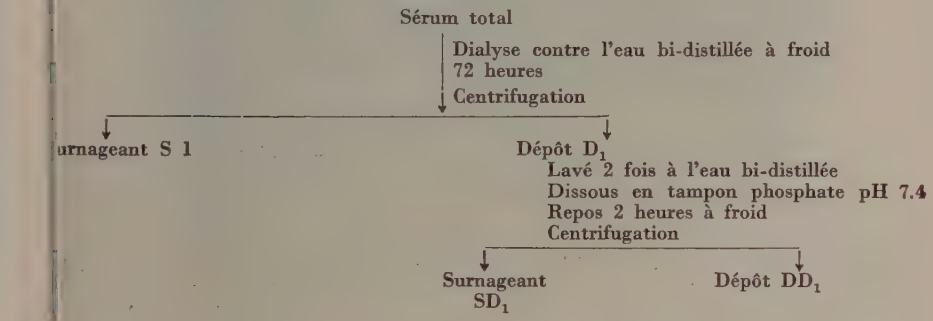
1. Sérum total
2. Surnageant Pp. I
3. Dépôt Pp. I
4. Surnageant Pp. II
5. Surnageant S II du filtrat I (AS II)
6. Surnageant S III
7. Dépôt final A (D)

Tableau II

	Albumine	α1 + α2	β2	β2	γ globuline	
érum total	23,51	8,70	10,82	7,59	49,48	
urnageant Pp. I	6,05	2,70	2,00	3,00	10,38	74,70
)épôt Pp.I	—	—	(1,70)	3,50	4,80	88,74
urnageant Pp II	4,90	27,35	38,77	7,03	21,90	
S II	84,20	4,33	—	11,75	0,60	
S III	86,40	—	13,60			

Schéma No. 3

FRACTIONNEMENT DU SÉRUM DE CHÈVRE PAR DIALYSE À FROID



ANALYSE DES RÉSULTATS

Avant de présenter les résultats obtenus à la suite du fractionnement des érums normaux et immuns de chèvre, nous citons quelques données concer-ant le sérum normal de chèvre.

A. De nos recherches, effectuées sur le sérum normal de chèvre, il ssort que:

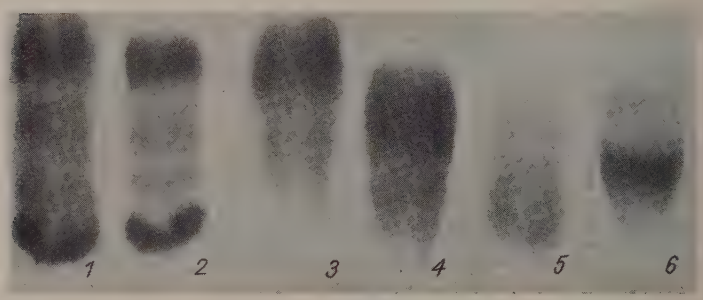
1. *L'examen électrophorétique* du sérum normal de chèvre, comparé 1 sérum normal d'autres espèces animales (homme, lapin, cheval, chien, souris) hotographies 5, 6 et 7), met en évidence 5 fractions protéiques: albumine globulines (alpha, bêta$_1$, bêta$_2$ et gamma). En ce qui concerne la position ccs fractions, les électrophorégrammes du sérum normal de chèvre ont énéralement un aspect comparable à celui du sérum normal humain, présen-nt néanmoins certaines particularités: 1) une albumine à migration plus rapide ue celle de l'albumine du sérum humain et 2) la vitesse de migration des obulines alpha est située entre celle des alpha$_1$ et des alpha$_2$ globulines du sérum umain. Il semble que les bêta-globulines du sérum de chèvre, du sérum normal e souris et de certains sérums pathologiques humains, se séparent en globu-nes bêta$_1$ et bêta$_2$ (photographie No. 5).

Le dosage des diverses fractions nous a permis de constater que tous les rums de chèvre expérimentés se caractérisent par une remarquable richesse

en gamma-globulines (28—40% pour le sérum normal et 35—49% dans les sérums immuns anti-pertussis du total des protéines sériques). (Tableau V, photographie 6, images 5 et 6).

Photographie No. 3

FRACTIONNEMENT PAR DIALYSE À FROID DU SÉRUM DE CHÈVRE



1. Sérum total
2. Surnageant S I
3. Dépôt D I
4. Surnageant du dépôt S D I
5. Dépôt du dépôt D D I
6. Dépôt du dépôt traité avec éther

Le sérum des chevreaux *nouveau-nés* est dépourvu de gamma-globulines, (fait constaté également par d'autres auteurs, dans le sérum de différents animaux jeunes) (photographie No. 6, image 2), le contenu en gamma-globulines augmentant après 2 à 5 jours et se rapprochant de celui du sérum de la chèvre adulte (photographie 6, tableau VI).

Tableau III

	Albumine	α	β1	β2	γ-globuline
Sérum total	41,80	8,75	11,50	10,20	27,00
Surnageant I	33,80	7,45	10,90	6,10	41,75
Dépôt I	—	—	5,10	13,90	81,00
Surnageant dépôt	—	—	1,50	11,50	87,50
Dépôt dépôt	—	—	—	—	—

Dans la photographie No. 7 se trouvent groupées les images électrophorétiques des glyco-et des lypoprotéines, en comparaison avec celles des protéinogrammes du sérum normal et immun de chèvre, ainsi que de celui d'un sérum pathologique humain. Les glycoprotéines paraissent être liées à une fraction protéique, ayant une vitesse de migration qui dépasse celle de l'albumine humaine, ainsi qu'aux alpha et bêta-globulines. Les lypoprotéines apparaissent dans des positions correspondant aux fractions: albumine, globulines ($bêta_1$, $bêta_2$, /concentration maximum/ et gamma).

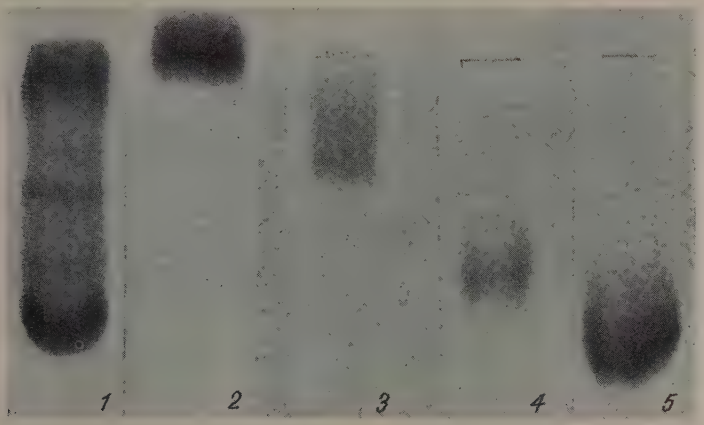
B. Les méthodes de fractionnement utilisées ont donné les résultats suivants:

1) *Le fractionnement au sulfate de sodium* donne, après une première précipitation (18% SO_4Na_2), un précipité qui contient 84% gamma-globulines et environ 14% d'autres globulines, en même temps que 2% d'albumine. Après

seconde précipitation (12% SO_4Na_2), la gamma-globuline est en concentration maximum; néanmoins le précipité contient encore *des bêta$_1$ et bêta$_2$ globulines* (15%), et, parfois, de très faibles traces d'alpha-globulines, l'albu-

Photographie No. 4.

FRACTIONNEMENT DU SÉRUM DE CHÈVRE PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER



1. Sérum total
2. Gamma-globuline
3. bêta-globuline
4. alpha-globuline
5. Albumine

Tableau IV

Variations individuelles des composants protéiques des sérums normaux de chèvre

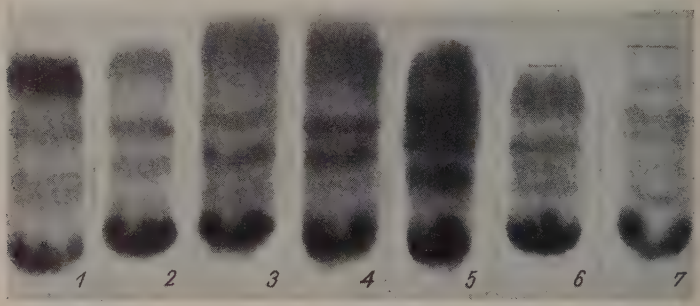
Sérum	Albumine	α	β1	β2	γ-globuline	Protéines totales gr. %
1	31,27	10,24	11,30	8,14	39,02	7,74
2	44,94	9,39	7,37	6,38	31,87	7,69
3	32,07	12,46	11,20	12,53	31,73	7,96
4	42,85	9,10	8,30	4,52	35,09	6,76
5	55,90	5,58	11,16	2,48	24,84	7,38
6	51,25	5,04	5,66	5,91	32,11	7,80
7	46,23	9,24	6,93	4,85	32,93	7,64
8	54,40	9,94	9,00	6,73	19,90	6,94
9	36,96	12,30	19,60	10,38	30,65	7,20
10	43,00	9,24	7,93	8,20	31,53	7,64
Valeurs moyennes	43,89	9,25	9,85	7,01	30,96	7,48

bine étant entièrement éliminée. Après la troisième précipitation et après dialyse, la gamma-globuline apparemment pure — du point de vue électro-phorétique — semble contenir encore une bêta$_2$-globuline (ou une gamma-globuline à migration plus rapide, comparable à celle de la fraction T du sérum anti-

diphtérique de cheval (25). L'aspect électrophorétique est pareil à celui de la gamma-globuline (fraction II), préparée par nous suivant la méthode Cohn, par précipitation à l'alcool, au froid.

Photographie No. 5

ELECTROPHORÈSE DU SÉRUM DE CHÈVRE NORMALE EN COMPARAISON AVEC CEUX D'AUTRES ESPÈCES ANIMALES



1. Sérum normal de chèvre
2. Sérum normal d'homme
3. Sérum normal de lapin
4. Sérum normal de cheval
5. Sérum de cheval-antitoxine-diphtérique
6. Sérum normal de chien
7. Sérum normal de souris

Tableau V

Valeurs procentuelles correspondant aux fractions protéiques séparées par électrophorèse dans le sang de différentes espèces d'animaux

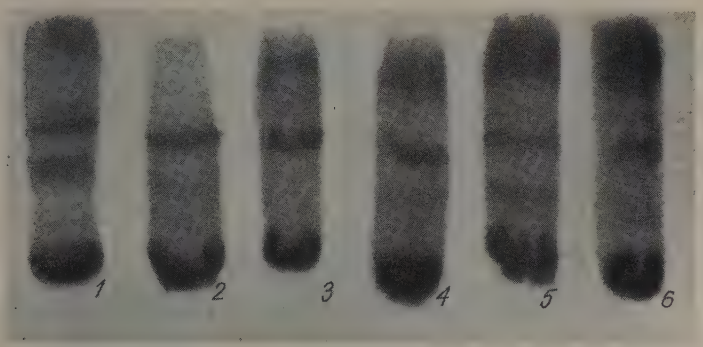
Sérum	Albumine	α_1	α_2	β_1	β_2	γ-globuline
Chèvre	31,00	15,40		15,20	8,35	30,70
Homme	46,70	5,50	14,24		14,30	19,22
Lapin	53,00	12,20	6,70		14,81	15,10
Cheval	41,90	8,10		14,61	10,20	25,10
Cheval antitoxine diphtérique	24,50	5,90	10,30	13,00	31,50	18,40
Chien	47,70	8,40	9,50	16,20		19,05
Souris	45,20	9,10	8,60	4,72	19,80	13.20

La méthode présente certains avantages: la précipitation des gamma-globulines se fait à la température de la chambre, s'effectuant rapidement (1—2 jours); en utilisant le sulfate de sodium en poudre, on évite l'augmentation de volume, ainsi que l'introduction de substances azotées et pyrogènes (27); on obtient une concentration en protéine active de 2,5—2,8 et, dans certains cas, de 3; on élimine 60—70% des protéines non-spécifiques et on isole 80—90% du total des gamma-globulines présentes dans le sérum. L'examen électrophorétique montre que le produit obtenu contient des gamma-globulines en proportion de 90%. La dialyse est plus rapide (surtout lorsque les solutions sont préalablement maintenues à +5°C, une grande partie du sel cristallisé

ouvant être éliminée par simple décantation). On a réussi, à l'aide de cette echnique, à purifier les sérums normaux et immuns frais de chèvre, ainsi que es sérums conservés pendant 2—3 ans à +5°C.

Photographie No. 6

DISTRIBUTION ÉLECTROPHORÉTIQUE DES FRACTIONS PROTÉIQUES DANS LE SÉRUM DU CHEVREAU ET DE LA CHÈVRE NORMALE ET IMMUNISÉE



1. Sérum normal d'homme
2. Sérum de chevreau qui n'a pas tété
3. Sérum de chevreau après deux jours
4. Sérum de chevreau après 5 jours
5. Sérum de chèvre immune
6. Sérum de chèvre normale.

Tableau VI

aleurs procentuelles des composants protéiques dans le sérum du chevreau et de la chèvre

Sérum	Albumine		β_1	β_2	γ-globuline	
nevreau qui n'a pas encore tété	55,60	11,30	16,20	18,10		0,0
hevreau 2 jours après. .	41,70	6,50	7,30	16,00		29,10
hevreau 5 jours après. .	39,48	4,20	8,10	16,50		30,05
nèvre normale	38,60	10,40	13,20		8,53	28,70
nèvre immunisée	30,20	8,05	12,85		8,05	41,60
érum pathologique d'homme (RAA)	45,70	5,50	17,24	11,30	6,50	16,22

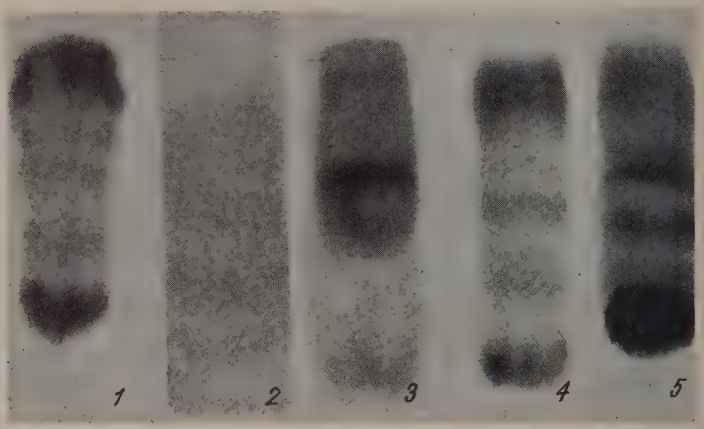
Chung et coll. en 1953 (3) ont exposé les résultats obtenus à la suite 'essais de purification, effectués à des fins thérapeutiques, du sérum anti-ertussis préparé sur le lapin, utilisant la fraction du sérum antimicrobien qui récipite à une concentration de 15,2% en SO_4Na_2. Sans donner des indica-ons sur la pureté du produit obtenu, les auteurs ont réalisé toutefois une oncentration satisfaisante du produit.

2) *Par fractionnement au sulfate d'ammonium* du sérum de chèvre, le précipité btenu par saturation à 33% est constitué d'un mélange de globulines. Après ialyse contre de l'eau distillée et centrifugation, on obtient un surnageant, ont les images électrophorétiques sont comparables à celles obtenues par

l'électrophorèse du sérum en gel (présence de 3 alpha-globulines), le dépôt contenant 90% du total des gamma-globulines (photographie 2, images 2 et 3). Après la deuxième précipitation (30—50%), dialyse et centrifugation, l'électro-

Photographie No. 7

PROTÉINOGRAMME GLUCIDOGRAMME ET LIPIDOGRAMME DU SÉRUM DE CHÈVRE



1. Sérum immun de chèvre-protéinogramme
2. Sérum immun de chèvre-glucidogramme
3. Sérum immun de chèvre-lipidogramme
4. Sérum normal de chèvre-protéinogramme
5. Sérum pathologique d'homme (RAA) (protéinogramme)

phorèse montre le même aspect du dépôt qu'après la première précipitation, tandis que le surnageant (image 4) semble être constitué, en grande partie, d'alpha et bêta-globulines. La troisième précipitation ne modifie pas l'aspect électrophorétique du précipité obtenu.

Le rendement en gamma-globuline (25—28%) de cette méthode est plus réduit que celui de la méthode précédente, la concentration ne dépassant pas 1,8 à 2,2.

Les techniques, utilisées en vue d'isoler l'albumine, donnent des résultats comparables, entre eux, du point de vue de la pureté des produits (sans considérer le rendement) (photographie 1, image 8 et photographie 2, image 6).

3) En ce qui concerne *le fractionnement* du sérum de chèvre *par simple dialyse à* $+5°C$, il résulte, des données exposées dans le tableau III et la photographie 3, qu'on peut obtenir par cette méthode une gamma-globuline qui présente une pureté électrophorétique de 80—85%, contenant en plus une $bêta_2$ ou $gamma_1$ globuline, dont l'image est plus évidente que celle des produits correspondants, obtenus par les deux autres méthodes. Ces observations, qui ont servi à l'étude de certaines propriétés chimiques et biologiques de ces fractions, seront exposées dans une note ultérieure.

4. Les images présentées dans la photographie No. 4 montrent que le *fractionnement par électrophorèse sur papier* permet d'obtenir une gamma-globuline qui, du point de vue électrophorétique, apparaît comme une fraction unique, sans présenter un spot dans la région des bêta-globulines. (Au cours du frac-

ionnement à l'alcool, au froid (méthode Cohn et coll.) le précipité produit par la variation de la température (—5°C) est le seul qui montre l'aspect électrophorétique de la gamma-globuline obtenue par fractionnement électrophorétique).

La quantité réduite des produits obtenus par cette technique, nous a obligé de les employer uniquement comme terme de comparaison pour la détermination de la mobilité électrophorétique, en vue de contrôler certaines de leurs propriétés sérologiques (6), ainsi que pour déterminer la composition et la séquence des aminoacides.

L'étude sur la présence des anticorps agglutinants dans ces fractions protéiques avec aspect électrophorétique pur, indique, ainsi que nous l'avons déjà montré dans une note antérieure, (6) que les agglutinines sont liées exclusivement à la gamma-globuline, qui détient, d'ailleurs, la majorité des anticorps protecteurs et neutralisants.

Des recherches en cours ont pour but de préciser la différenciation des anticorps protecteurs et neutralisants, présents dans la solution de gamma-globuline anti-pertussis.

En ce qui concerne la *composition en aminoacides* des diverses fractions protéiques obtenues (albumines, alpha, bêta et gamma-globulines isolées du sérum normal et du sérum immun), les analyses effectuées, montrent des différences d'ordre quantitatif, mais non d'ordre qualitatif, entre les composants des hydrolysats acides des fractions protéiques isolées du sérum de chèvre, normal et immun. Ces observations concordent avec quelques-unes des indications concernant les gamma-globulines isolées du sérum d'autres animaux, normaux ou immunisés (12, 22, 25). On a mis en évidence les suivants aminoacides: cystine, lysine, arginine, acide aspartique, sérine, glycocolle, thréonine, alanine, proline, tyrosine, valine, phényl-alanine, leucine, isoleucine. Des recherches sur la détermination quantitative des amino-acides contenus dans les hydrolysats acides, ainsi que dans les hydrolysats des dérivés de type Sanger (23), obtenus des fractions protéiques respectives, sont en cours; les résultats seront présentés dans un mémoire ultérieur.

CONCLUSIONS

Afin de préparer de la gamma-globuline anti-coquelucheuse on a fractionné le sérum de chèvre anti-pertussis: 1) par précipitation saline (au sulfate de sodium et au sulfate d'ammonium); 2) par dialyse à +5°C et 3) par électrophorèse sur papier. On a utilisé des mélanges de sérums immuns mixtes (antimicrobiens et antitoxiques) frais ou conservés pendant 2—3 ans à +5°C. Les mêmes techniques ont été appliquées pour l'étude et le fractionnement du sérum normal de chèvre.

Parmi les techniques employées (suivant le critérium du contrôle de la pureté des produits par la méthode de l'électrophorèse sur papier), celle par précipitation saline (SO_4Na_2) est la plus indiquée pour la préparation du produit à fins thérapeutiques, présentant les avantages suivants: les opérations de précipitation peuvent s'effectuer à la température de la chambre, à l'aide d'une substance en poudre, dépourvue d'azote et à pyrogénité réduite. On réalise une concentration triple en volume et une récupération de 80—90% de la gamma-globuline du sérum total; le produit final contient 90% gamma-globulines. La gamma-globuline anticoquelucheuse, isolée par nous, possède un titre agglutinant limite de 170.000, une action neutralisante 74% et un pouvoir protecteur moyen de 76%. (6).

Par rapport aux autres techniques essayées, la dialyse à +5°C du sérum a également donné des résultats satisfaisants.

Nous étudions actuellement les conditions capables d'assurer le maintien des propriétés biologiques et physico-chimiques du produit. La lyophilisation et le traitement au merthyolate semblent, d'après les premiers résultats obtenus, ne pas modifier les propriétés de la gamma-globuline.

BIBLIOGRAPHIE

1. Block R. G., Durrum E. L. et Zweig G. — A manual of paper chromatography and paper electrophoresis — Academic Press, N. Y., 1955.
2. Babaeva S. N. et Podolskaia A. A. — Jurnal Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1956, No. 4, 3.
3. Chung K., Liu C. H. et Hsiang C. S. — Chin. Med. J., 1953, **5**, 371.
4. Ciba — Foundation Symposium on Paper Electrophoresis, 1956, J. a. A. Churchill, LTD., London.
5. Debro R., Tarver H. et Korner A.: — J. Lab. a Clin. Med., 1957, **50**, 728.
6. Ţigoiu-Andreesco V. et Vainer H. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1960, **19**, 19.
7. Golaesco Maria. — Viaţa medicală 1959, **6**, 289.
8. Gottfried P. S. et Pope A. R. — J. Lab. a Clin. Med., 1954, 44, 651.
9. Ghendon I. Z. — Jurnal Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1956, No. 9, 91.
10. Grassman W. et Hannig K. — Naturwiss., 1950, **37**, 397.
11. Haag W. — Ann. Biol. Clin., 1956, 5—6, 465.
12. Haurowittz F. — The chemistry a. Biology of proteins. Academic Press — New-York 1950
13. Ionesco-Mihăieşti C. et Dâmboviceanu A. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1935, **8**, 269.
14. Ionesco-Mihăieşti C., Dâmboviceanu A. et Vainer H. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1959, **18**, 323.
15. Ionesco-Mihăieşti C., Dâmboviceanu A. et Vainer H. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1957, **16**, 1.
16. Jenkes W. P. et Jetton M. R. — Biochem. J., 1955, **60**, 205.
17. Kekwick A. R. — Biochem., 1940, **34**, 1248.
18. Lederer M. — An introduction to paper electrophoresis and related methods Elssvier Publ. Co. 1955.
19. Loiseleur J. — Techniques de laboratoire, 1954, 2, 507, Ed. Masson et Cie., Paris.
20. Partridge M. S. — Biochem. J., 1948, **42**, 238.
21. Palant B. L., Fintikticova R. S. et Mitelman P. M. — Jurnal Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1955, No. 12, 51.
22. Porter R. R. — Biochem. J., 1950, **46**, 473.
23. Sanger F. — Biochem. J., 1945, **39**, 507.
24. Skearova N. N. — Jurnal Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1955, No. 10, 71.
25. Smith E. L., Mc Fadden M. L., Stockell A. et Buettner J. V. — J. biol. chem., 1955, **214**, 1957.
26. Soloviov V. D. et Marcenko V. I. — Jurnal Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1955, No. 2, 3.
27. Vainer H. — Microbiol., Parazitol., Epidemiol., 1957, **2**, 3.
28. Wunderly Ch. — Electrophorèse sur papier, Paris Vigot Frères, Ed. 1956.

ХИМИЧЕСКОЕ, ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ И БИОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ КОЗЬЕЙ ПРОТИВОКОКЛЮШНОЙ СЫВОРОТКИ

Сообщение II-*ое*. ИЗГОТОВЛЕНИЕ ПРОТИВОКОКЛЮШНОГО ГАММА-ГЛОБУЛИНА

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Изложены детально методики, применяемые для отделения сывороточных фракций — как в нормальной сыворотке, так и в противококлюшной. Для этой цели применяли: дробление при помощи сульфата натрия, дробление сульфатом аммония, дробление при помощи холодного диализа и дробление при помощи электрофореза.

При всех стадиях, полученные препараты анализировались электрофоретически, при ом изучали как надосадочные жидкости, так и осадки.

Анализ совокупности результатов с точки зрения возможности применения в практике пособов очистки при изготовлении противококлюшных гамма-глобулинов, ведет к выводу, то методика очистки при помощи высаливания с SO_4Na_2 является повидимому наиболее одходящей. При помощи данной методики удается получить апирогенный, биологически ктивный препарат, содерживаюший 90% гамма-глобулиина, электрофоретически сходного II-ой фракцией, полученной путем дробления спиртом на холоду, по методу Кона с сотрудниками.

Имея в виду спорадические данные, находящиеся в литературе в отношении нормальной козьей сыворотки, мы изучили — с электрофоретической точки зрения-эту сыворотку животных разного возраста, сравнительно с человечьими сыворотками и сыворотками абораторных животных. Выявлено полное отсутствие гамма-глобулинов в сыворотке оворожденного козленка и присутствие этих фракций в довольно большой концентрации, пустя 3—5 дней от рождения. В сыворотке нормальной взрослой козы выявлены обычно присутствующие сывороточно-белковые фракции, с некоторыми отличиями во что касается их электрофоретической подвижности:, отмечается особенная обильность гамма- глобулина этой сыворотке.

CHEMISCHE, IMMUNCHEMISCHE UND BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER ANTIPERTUSSIS-ZIEGENSERUM

2-te Mitteilung. DIE HERSTELLUNG VON ANTIPERTUSSIS-GAMMA ŞI GLOBULIN

ZUSAMMENFASSUNG

Die Methodik der Isolierung von Serumfraktionen, sowohl aus Normal- als auch us Antipertussisserum, wird im Einzelnen beschrieben. Verwendet wurden zu diesem Zweck: lie Fraktionierung mit Natriumsulphat, die Fraktionierung mit Ammoniumsulphat, die raktionierung durch Dialyse in der Kälte und die Fraktionierung durch Elektrophorese.

In allen Etappen wurden die erhaltenen Produkte und zwar sowohl die überstehenden lüssigkeiten als auch die Präzipitate, auf elektrophoretischem Wege geprüft.

Eine Analyse der Gesamtheit der Ergebnisse vom Standpunkt der praktischen Anwenlungsmöglichkeiten der Reinigungsmethoden bei der Herstellung der Antipertussis-Gammaglobuline, führt zum Schluss, dass die Methode der Aussalzung mit SO_4 Na_2 am angezeigtesten u sein scheint. Man erhält dadurch ein biologisch aktives, nicht pyrogenes Präparat, das u 90% aus Gammaglobulin besteht und von elektrophoretischem Standpunkt der durch Alkoholfraktionierung in der Kälte, nach der Methode von Cohn und Mitarb. erhaltenen Fraktion II ähnlich ist.

Die Spärlichkeit der in der Fachliteratur vorliegenden Daten über das normale Ziegenerum bestimmten uns dieses Serum bei verschiedenen Alterstufen, im Vergleich mit Menschenerum und den Sera von Laboratoriumstieren zu untersuchen. Im Serum des neugeborenen Zickleins konnte die vollkommene Abwesenheit der Gammaglobuline nachgewiesen werden; —5 Tage nach der Geburt sind sie in ziemlich erheblicher Menge vorhanden. Im Serum normaler, erwachsener Ziegen wurden die üblichen Serumeiweissfraktionen nachgewiesen, lie jedoch einige Unterschieden bezüglich ihrer elektrophoretischen Mobilität aufweisen. Der besonders hohe Gehalt dieses Serums an Gammaglobulin ist auffallend.

A CHEMICAL, IMMUNOCHEMICAL, AND BIOLOGICAL STUDY OF ANTI-PERTUSSIS GOAT SERUM

2nd Note. — PREPARATION OF ANTI-PERTUSSIS GAMMA-GLOBULIN

SUMMARY

The methods used for the isolation of serum fractions from normal and from anti-pertussis sera are detailed. Sodium sulphate, ammonium sulphate, dialysis in the cold, and electrophoresis were used for this purpose.

The products obtained, i.e. the supernatants as well as the precipitates, were analysed by electrophoresis at the end of each step of the procedure.

As regards the possibilities of applying various methods of purification in practice for the preparation of anti-pertussis gamma-globulins, an analysis of the findings results in the conclusion that salting out with SO_4Na_2 appears to be the most adequate procedure. The product obtained is biologically active, non-pyrogenic, and contains 90% gamma-globulin, thus displaying a certain electrophoretic similarity to fraction II obtained by alcohol fractionation in the cold according to Cohn's method.

Few data have been published concerning normal goat serum. This has determined us to investigate such sera by electrophoresis at various ages and to compare them with human sera and sera of laboratory animals. Gamma-globulins were found to be totally absent in the sera of new-born kids. Three to five days after birth they are present in rather considerable amounts. In the sera of normal adult goats the common serum fractions were found to exist. They display some peculiarities as regards electrophoretic mobility and the high contents of gamma-globulins are remarkable.

Notre article était déjà en cours de publication lorsque nous est parvenu l'article de M. Juillan et Mme J. Bati Maillet: «Etudes des protéines sériques et de l'apotémie chez la chèvre normale» (Arch. de l'Inst. Pasteur d'Algérie, 1959, 37|2, 305).

ÉTUDE CHIMIQUE, IMMUNO-CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DU SÉRUM ANTI-PERTUSSIS DE CHÈVRE

Note III. L'ANALYSE PAR DIFFUSION ET IMMUNOÉLECTROPHORÈSE EN GEL DES SÉRUMS NORMAUX ET ANTI-PERTUSSIS DE CHÈVRE, DES GAMMA-GLOBULINES ET DES ALBUMINES ISOLÉES DE CES SÉRUMS

par

HENRIETTE VAINER et VIORICA ANDREESCO

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Services d'Immuno-Chimie et de B. Pertussis)

— Manuscrit reçu le 22 mai 1959 —

Dans des travaux antérieurs, on a présenté la méthode de préparation d'un sérum anti-pertussis de chèvre (7), ainsi que l'analyse des méthodes de fractionnement, appliquées à ce sérum, en vue de la préparation de la gamma-globuline anti-coquelucheuse (2, 4, 24).

Les résultats des déterminations biologiques, chimiques et électrophorétiques ont montré que les sérums anti-pertussis totaux, préparés sur la chèvre, ont des titres agglutinants élevés et que la gamma-globuline, isolée de ces sérums, détient — en plus de la majorité des agglutinines — le pouvoir neutralisant et protecteur du sérum total.

Dans le présent travail, nous exposons les résultats de l'étude immuno-chimique des sérums totaux et des composants protéiques normaux et immuns, isolés de ces sérums.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Antigènes utilisés : Sérum normal de chèvre (SN), sérum anti-pertussis de chèvre (SI), gamma-globuline et albumine normale (GN et AN) isolées du sérum normal et gamma-globuline et albumine immune, isolées du sérum immun (GI et AI). Le sérum immun total a été préparé sur la chèvre, suivant une technique exposée dans une note antérieure (9). La gamma-globuline a été obtenue par précipitation avec du $SO_4\ Na_2$ (22) et l'albumine par précipitations ultérieures avec du $SO_4\ (NH_4)_2$. Les sérums totaux normaux et immuns, ainsi que les fractions protéiques isolées de ces derniers, ont été utilisés pour la préparation des anti-sérums correspondants sur le lapin et comme réactifs dans les réactions immunochimiques.

Préparation des anti-sérums sur le lapin. Six groupes de 6 lapins chacun (2000—2500 gr.) ont reçu, par voie intrapéritonéale, un des antigènes SN, SI, GN, GI, AN, AI. On a effectué 8 inoculations à des intervalles d'une semaine, chaque inoculation contenant: 5 ml des sérums totaux (7.75 gr protéine % ml), 1,5 ml des solutions de gamma-globulines (5.5—6 gr protéine % ml) et 4 ml des solutions d'albumine (2.8—3 gr protéine % ml). On a employé comme adjuvant, une quantité égale (v/v) de suspension d'hydroxyde d'aluminium à 1,6 mg % ml, pH = 7,0.

La récolte du sang a été effectuée 10 jours après la dernière inoculation. On a obtenu les anti-sérums suivants: anti-SN, anti-SI, anti-GN, anti-GI, anti-AN et anti-AI; ces sérums ont présenté des *titres précipitants*, variant entre 20.000 et 30.000 (exprimés par la réciproque des dilutions).

Le titre précipitant optime des sérums a été établi par la méthode de DEAN et WEBB (5). 0,5 ml des solutions d'antigènes (SN, SI, GN, GI, AN et AI) diluées en solution physiologique 0,85% NaCl (g/v), à partir de 1 : 10 à 1 : 20.480, ont été mises en contact avec 0,5 ml des anti-sérums homologues de lapin, dilués 1 : 40. Les tubes ont été maintenus (au bain marie) à 37°C. On a noté le premier tube dans lequel est apparu le précipité.

Les antisérums ont présenté les titres précipitants optimes suivants (exprimés par la réciproque de la dilution): 160 pour le système précipitant AN -anti AN, 320 pour les systèmes GI-anti GI, AI-anti AI et GN-anti GN et 5120 pour SN-anti SN et GI -anti GI.

Pour l'identification des précipitations spécifiques dans les réactions de diffusion et d'immunoélectrophorèse, on a utilisé des *anti-sérums adsorbés* (6). L'adsorption a été effectuée à l'aide d'antigènes et anti-sérums correspondant à la zone de précipitation optime. Après maintien de 60 minutes à 37°C (bain marie) et à + 4°C pendant la nuit, les mélanges ont été centrifugés 30 minutes à 16.000 t/m. On a obtenu les sérums adsorbés anti-SN ads., anti-SI ads, anti-GN ads, anti-GI ads, anti-AN ads et anti-AI ads. Ces derniers ne donnent plus de précipités, lors d'une nouvelle addition d'antigène. En résumé, dans le présent travail, on a employé les antigènes et les anti-sérums suivants:

Antigènes	Anti-sérums de lapin	
	Totaux	Adsorbés
Sérum normal de chèvre (SN)	anti-SN (a SN)	anti-SN ads (a SN ads)
Gamma-globuline isolée du sérum normal de chèvre (GN)	anti-GN (a GN)	anti-GN ads (a GN ads)
Albumine isolée du sérum normal de chèvre (AN)	anti-AN (a AN)	anti-AN ads (a AN ads)
Sérum immun de chèvre (SI)	anti-SI (a SI)	anti-SI ads (a SI ads)
Gamma-globuline isolée du sérum immun de chèvre (GI)	anti-GI (a GI)	anti-GI ads (a GI ads)
Albumine isolée du sérum immun de chèvre (AI)	anti-AI (a AI)	anti-AI ads (a AI ads)

Les précipitations spécifiques en gel ont été effectuées par la méthode de la double diffusion en gel, décrite par OUCHTERLONY (14).

La gélose en fibres a été dialysée pendant 72 heures contre l'eau distillée à froid et 24 heures contre l'eau bi-distillée (fréquemment renouvellée) et ensuite séchée à 40°C.

Dans chaque expérience, la gélose a été suspendue (1.25% g/v), en tampon phosphate 0,1 M et pH = 7,0 ou en tampon médinal-véronal pH 8,4μ = 0,05, avec addition de merthiolate 1/10.000. Pour l'étalage du gel de gélose on a employé des boîtes Petri (Pyrex) à diamètre de 14 cm et des lames de verre (24 × 4 cm); (10 × 4 cm) et (7 × 3 cm). Le diamètre des godets pour les réactifs était de 1 cm, placés à des distances de 1 cm (pour les boîtes Petri et les lames 24 × 4 cm), de 0,3 cm à des distances de 0,5—0,8 cm (pour les lames de 10 × 4 cm) et de 0,2 cm à des distances de 0,3—0,5 cm (pour les lames de 7/3 cm).

Dans le cas des systèmes fortement précipitants, les lignes de précipitation apparaissaient après: 2—4 heures (lame 7 × 3), 16—18 heures (10 × 4 cm) et 2—5 jours (boîtes Petri et lames 24 × 4 cm) (à la température de la chambre).

L'immunoélectrophorèse en gel a été effectuée d'après la méthode décrite par GRABAR et WILLIAMS (9), suivant les indications de SCHEIDEGGER, URIEL, KAMINSKY (10, 20, 21).

Nous avons utlisé: *a)* gélose 1,25% g/v, suspendue en tampon médinal-véronal, pH 8,4μ = 0,05 ou pH 8,2μ = 0,035, étalée sur lames de 24 × 4 cm dans une couche de 3 mm d'épaisseur. *b)* solution tampon médinal-véronal, pH 8,4μ =0,1 et pH 8,2μ =0,070; *c)* la migration électrophorétique a été effectuée sous une tension de 180—210 V et 12—15 mA, durant 12—14 heures, à la température de la chambre, pour la migration des composants protéiques sur une distance de 12—15 cm; pendant 5—6 heures pour une migration de 9—10 cm et, lorsqu'on utilise l'immuno-microélectrophorèse sur petites lames (7,5 × 2,5), 45—60 minutes pour un parcours de 4,5 cm. Le liquide à analyser a été déposé dans un godet central (diamètre 1 cm ou dimensions de 1 × 0,3 cm), le contact du gel d'agar avec la solution tampon étant pratiqué à l'aide de bandes de 7 × 4 cm en papier Whatman No. 1.

Après la migration, on a pris des copies de la surface de la gélose sur papier filtre Whatman, qui ont été développées au bleu de bromphénol 0,1% ou amido-schwarz 10 B. Connaissant le parcours de la migration, des canaux ont été pratiqués de chaque côté du godet central, le long de la lame, en couvrant la distance nécessaire. Après l'introduction du réactif précipitant, les préparations ont été maintenues dans une atmosphère humide, à la température de la chambre et contrôlées à divers intervalles. Le séchage et la coloration ont été effectués dans les conditions habituelles (5, 18).

La reproduction des images a été faite par photographie ou par exécutions au lavis.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Précipitations en gel. Les résultats, obtenus par suite de l'application de la technique de la diffusion en gel aux sérums de chèvre normaux et immuns, aux fractions protéiques isolées de ces sérums (albumine et globuline normales et immunes), ainsi qu'aux anti-sérums de lapin correspondants, tels quels et après adsorption, nous ont montré.:

A) *Réactions de diffusion en gel entre les antigènes et les anti-sérums homologues et hétérologues, dans les conditions des réactions de précipitation en milieu liquide.* Dans les réactions de précipitation en gel, effectuées dans les conditions des réactions en milieu liquide (solutions d'antigène en dilutions progressives et anti-sérum non-dilué, en quantités égales (v/v), on a obtenu des images pareilles à celles présentées dans les figures 1,2, 3. Il résulte des lignes de précipitation obtenues dans ces conditions, que:

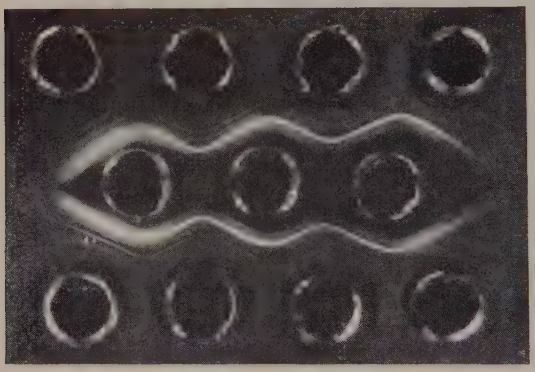
Le sérum immun total (SI), non-dilué (photo 1), précipite avec l'anti-sérum homologue (anti SI), formant un groupe de 8 lignes de précipitation, dont 4 persistent également dans les réactions avec le sérum immun dilué.

Le sérum normal total (SN), non-dilué (photo 2), précipite en présence de l'anti-sérum homologue, non-dilué, formant un groupe de 5 lignes de précipitation, dont quelques-unes persistent aussi en présence du sérum SN dilué.

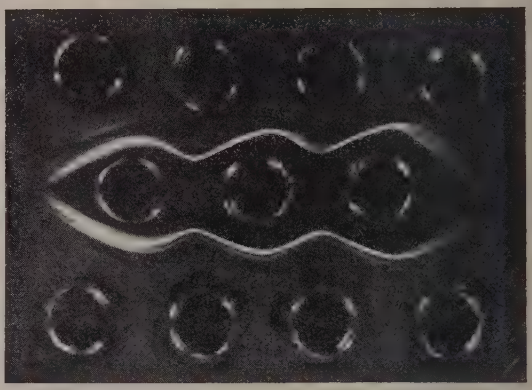
Toutefois, SI précipite également avec anti SN et SN précipite avec anti-SI, à la seule différence que dans les systèmes avec les réactifs spécifiques (par ex.: SI-anti SI; SN-anti SN), l'une des lignes de précipitation est nette, tant à l'épreuve diluée que non-diluée (photos 1 et 2), alors que cette ligne disparaît aux épreuves diluées, dans les systèmes à réactifs hétérologues (SI-anti SN; SN-anti SI).

Les fractions GI et AI, en contact avec le sérum de lapin anti SI (photo 3), ainsi que GN et AN en contact avec le sérum anti SN, présentent un nombre

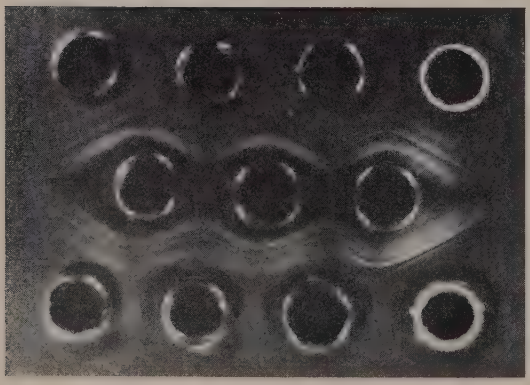
RÉACTIONS DE DIFFUSION EN GEL ENTRE LES ANTIGÈNES ET LES ANTI-SÉRUMS HOMOLOGUES ET HÉTÉROLOGUES, DANS LES CONDITIONS DES RÉACTIONS DE PRÉCIPITATION EN TUBE



Photographie 1. — SI (Sérum immun total). aSI (anti-sérum non-dilué) SN (Sérum normal total).



Photographie 2. — SI (Sérum immun total). aSN (Anti-sérum normal non-dilué). SN (Sérum normal total).



Photographie 3. — GI (gammaglobuline immune). aSI (Anti-sérum immun non-dilué). GN (gammaglobuline normale).

e lignes communes, dont quelques unes plus intenses persistent même aux preuves diluées et s'identifieraient au précipité spécifique.

B) *Réactions de diffusion en gel, entre les antigènes et les anti-sérums correspondants, adsorbés avec les antigènes hétérologues.* Dans ces expériences, on a oursuivi les réactions de précipitation entre les anti-sérums totaux ou adsorbés avec les antigènes hétérologues, ex: anti-SI adsorbé avec SN) et les antigènes espectifs, non-dilués et en dilutions progressives (photographies 4, 5, 6). On a onstaté que les anti-sérums totaux réagissent avec les antigènes respectifs, donnant n nombre varié de lignes de précipitation, tandis que les anti-sérums adsorbés, ie donnent plus de lignes de précipitation avec les antigènes respectifs.

C) *Réactions de diffusion en gel, entre les antigènes et les anti-sérums homologues et hétérologues, utilisés dans les proportions correspondant aux titres précipitants optimes.* Si l'on tient compte de la zone de précipitation optime des ystèmes précipitants respectifs, — utilisant des réactifs dans des dilutions qui correspondent au titre précipitant établi préalablement, en comparaison avec es sérums non-adsorbés, on obtient une simplification des aspects. Les figures numéros 7, 8, représentent les réactions de précipitation qui se sont produites dans ces conditions. De leur analyse, il ressort qu'une série de lignes de précipitaion apparaissent aussi bien dans les réactions entre les antigènes avec les sérums otaux de lapin, qu'avec les sérums adsorbés, tandis que certaines lignes de précipitation apparaissent seulement dans le cas de l'emploi des sérums totaux.

Ainsi, l'antigène GI (fig. 7) précipite avec le sérum anti-GI, donnant 4 ignes de précipitation: la ligne 1, apparaît aussi en présence du sérum adsorbé nti-GI (fig. 8); la ligne 2 est commune dans les réactions du AN avec le érum anti-AI et AI avec le sérum anti-AN; la ligne 4 s'identifie avec les lignes le précipitation non-spécifiques de l'AN et AI avec le sérum anti-GI. Seule a ligne 3, faisant défaut dans la précipitation par le sérum adsorbé anti-GI, ne s'identifie pas avec d'autres lignes et représente la ligne de précipitation spécifique entre GI et le sérum anti-GI.

Entre GI et le sérum anti-AN apparaissent également 4 lignes de précipitation: les lignes 5 et 8 apparaissant aussi entre GI et le sérum adsorbé anti-AN (fig. 8), alors que les lignes 6 et 7 sont partiellement (ligne 6) ou entièrement (ligne 7) identiques à la ligne de précipitation 2.

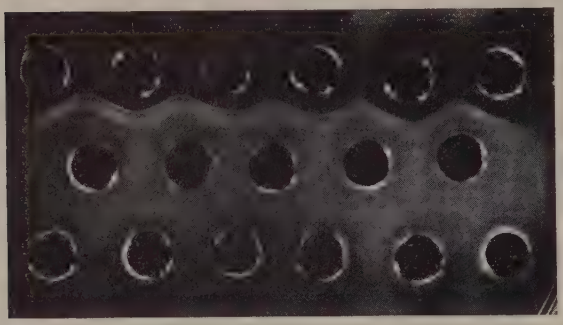
Entre GI et le sérum anti-GN, apparaît une seule ligne de précipitation, qui se montre également entre GI et le sérum anti-GN, entre GI et le sérum anti-AI, alors qu'entre GI et le sérum adsorbé anti-AI, apparaissent les lignes de précipitation 10 et 11.

Par conséquent, de toutes les lignes de précipitation apparaissant entre l'antigène GI et les anti-sérums anti-GI, anti-AN, anti-GN et anti-AI, seule la ligne 3, obtenue dans la réaction GI-anti GI, est spécifique.

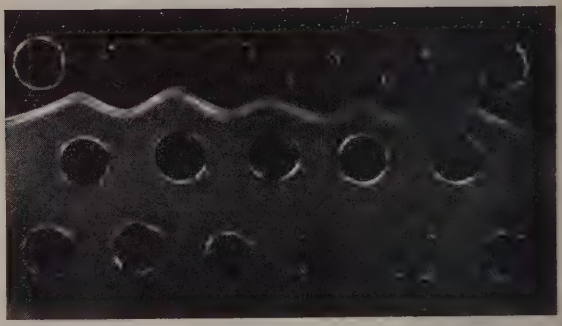
Entre l'antigène AI et le sérum anti-AI (fig. 7) apparaissent 3 lignes de précipitation, deux d'entre elles (12 et 14) (fig. 8) apparaissant également dans la réaction avec le sérum adsorbé anti-AI; la ligne 13 correspond à celle de précipitation spécifique.

Entre AI et le sérum anti-GN (fig. 7) apparaît la ligne de précipitation 15, commune à celle obtenue avec le sérum adsorbé anti-GN (fig. 8); entre l'antigène AI et le sérum anti-AN, apparaissent 4 lignes de précipitation, dont 3: 16, 17, 19, sont communes à celles données par le sérum adsorbé anti-AN (fig. 8); la ligne 18 s'identifie avec la ligne 2. Entre AI anti-GI apparaît la ligne 20, qui s'identifie avec la ligne 4.

RÉACTIONS DE DIFFUSION EN GEL ENTRE LES ANTIGÈNES ET LES ANTI-SÉRUMS CORRESPONDANTS ADSORBÉS AVEC DES ANTIGÈNES HÉTÉROLOGUES



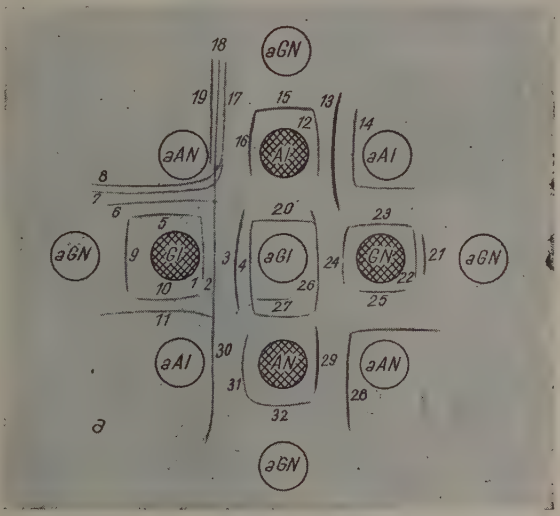
Photographie 4. — aSI (Antisérum immun total) SI (Sérum immun total non-dilué). aSI ads (Antisérum immun total adsorbé sur SN)



Photographie 5. — aSN (Antisérum normal total) SN (Sérum normal total non-dilué). aSN ads (Antisérum normal total adsorbé sur SI).

Photographie 6. — aGI (Sérum anti-globuline immune) GI (globuline immune non-diluée). aGI ads (Sérum anti-globuline immune adsorbé sur GN).

Éliminant les lignes de précipitation qui apparaissent entre l'antigène AI et les sérums adsorbés, ainsi que celles s'identifiant avec les lignes appartenant



Photographie 7 — Réactions de précipitation entre antigènes et anti-sérums (homologues et hétérologues (dilutions correspondantes au titre précipitant optime).

Antigènes

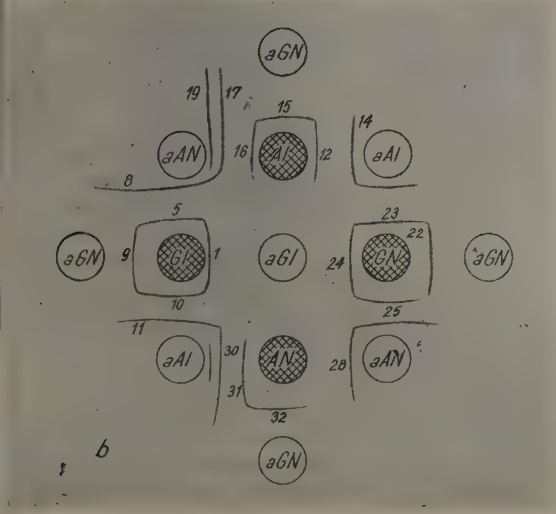
GI = globuline immune. GN = globuline normale. AI = albumine immune. AN = albumine normale

Anti-sérums

GI = sérum anti-globuline immune.
GN = sérum anti-globuline normale.
AI = anti-albumine immune.
AN = anti-albumine normale.

d'autres systèmes de précipitation, il subsiste, même dans le cas de l'antigène AI, une seule ligne de précipitation spécifique AI-anti-AI, (la ligne 13).

Entre l'antigène GN et le sérum anti-GN, on constate l'apparition de 2 lignes de précipitation; la ligne 21, spécifique et la ligne 22, que nous retrou-



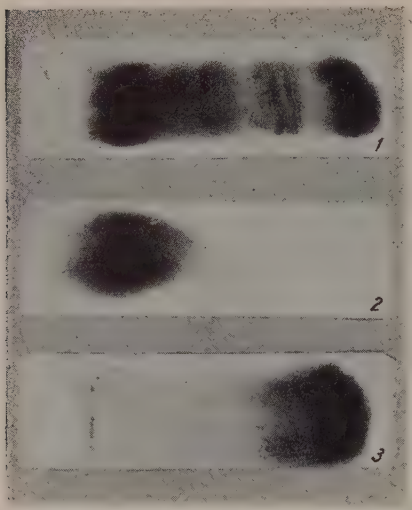
Photographie 8. — Réactions de précipitation entre antigènes et anti-sérums (homologues et hétérologues) adsorbés avec des antigènes correspondants au titre précipitant optime.

Antigènes

GI = globuline immune. GN = globuline normale. AI = albumine immune. AN = albumine normale

Anti-sérums adsorbés

aGI ads = sérum anti-globuline immune ads. aGN ads = sérum anti-globuline normale. aAI = ads = anti-albumine immune ads aAN ads = anti-albumine normale.



Photographie 9. — Electrophorégrammes du sérum immun total et des fractions protéiques isolées.

1. Sérum immun total
2. Gamma-globuline
3. Albumine

vons dans la réaction avec le sérum adsorbé anti-GN, qui s'identifie, en même temps, avec les lignes non-spécifiques 23, 24 et 25; entre GN et les sérums anti-AI, anti-GI et anti-AN apparaissent des lignes de précipitation qui persistent même avec les anti-sérums adsorbés. On constate, en plus, une ligne de précipitation (ligne 26) partiellement identique aux lignes 20 et 27, cas dans lequel persiste une seule ligne spécifique donnée par le système GN-sérum anti-GN.

Toujours une seule ligne (ligne 29) de précipitation spécifique est constatée entre l'antigène AN et le sérum anti-AN. La seconde ligne de précipitation (ligne 28) apparaît aussi avec le sérum anti-AN adsorbé (fig. 8); entre AN et le sérum anti-GN, apparaît une seule ligne de précipitation et deux lignes situées entre l'AN et le sérum anti-AI; toutes ces lignes de précipitation se montrent également dans les réactions avec les sérums adsorbés (fig. 8), les deux lignes de précipitation entre AN-anti-GI étant identiques aux lignes 4 et 26.

Eliminant les lignes de précipitation qui, d'après nos analyses, paraissent être non-spécifiques (soit qu'elles persistent dans les réactions de précipitation avec les sérums adsorbés, soit qu'elles présentent une identité partielle ou totale, avec les lignes apparaissant dans d'autres systèmes de précipitation), on obtient, avec toutes les 4 fractions isolées du sérum de chèvre, à part une série de lignes non-spécifiques, une ligne de précipitation spécifique dominante, dans les réactions avec les anti-sérums homologues (fig. 8.)

Analyse immuno-électrophorétique. Dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus, on a mis en évidence dans le sérum total de chèvre, 12 fractions protéiques, à l'aide des anti-sérums préparés sur le lapin: une fraction dans la position de l'albumine, une fraction dans la position de l'alpha -globuline, 3 lignes dans la position de l'alpha$_2$-globuline, 3 lignes dans la position des bêta$_1$-globuline, trois dans la position de la bêta$_2$-globuline et 1 ligne dans la position de la gamma-globuline (fig. 10).

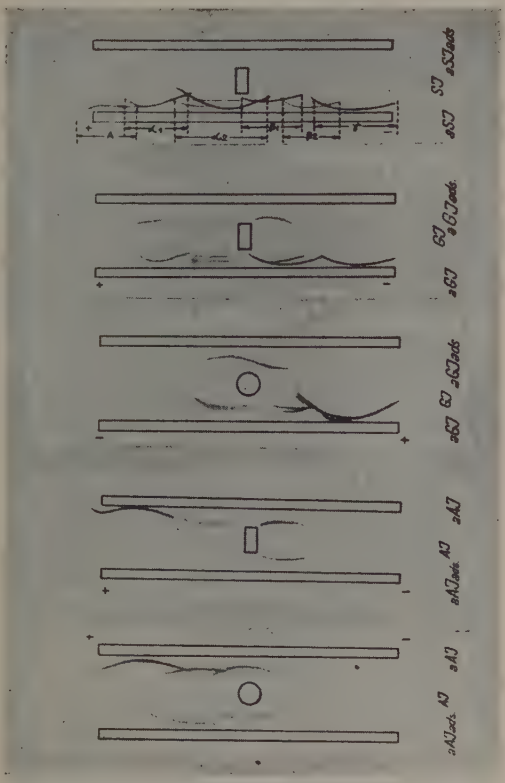
Dans les réactions entre SN et le sérum anti-SN, apparaissent les mêmes lignes de précipitation, à l'exception de celles qui correspondent à la fraction identifiée dans la position de la bêta$_2$-globuline (pouvant être une fraction gamma rapide ou bêta lente) du sérum immun (fig. 11). Par l'épuisement des anti-sérums de lapin avec les antigènes homologues, sont éliminées toutes les lignes de précipitation entre SI-anti-SI et SN-anti-SN (fig. 10).

L'antigène GI (fig. 9) présente, au contrôle électrophorétique sur papier, un spot très intense dans la région des gamma-globulines et — en solutions à forte concentration — un second spot, dans la position de la bêta$_2$-globuline. L'électrophorèse en gel isole nettement les mêmes composants. L'immuno-

ectrophorèse (fig. 10 images b
c) effectuée par la migration
e l'antigène GI et la diffusion
ltérieure du sérum anti-GI,
ermet la mise en évidence d'un
roupe de lignes de précipita-
on, voire: une ligne a intensité
aximum dans la région de la
amma-globuline, deux lignes
ans la région de la gamma$_1$ ou
êta$_2$-globulines, 2 lignes à in-
nsité très réduite dans la ré-
ion de la bêta$_1$-globuline et,
ans certaines préparations, des
gnes dans la position des bêta$_1$
t alpha-globulines (image b).
a réaction de précipitation pra-
quée comparativement avec
sérum anti-GI adsorbé (a
I-ads.) présente une ligne très
iscrète dans la position de la
amma-globuline et une ligne
ette dans la position corres-
ondant à la fraction bêta-glo-
uline, qui correspond à son
our à la seconde ligne de pré-
ipitation avec le sérum anti-GI.
es autres lignes de précipita-
ion sont semblables à celles
btenues avec le sérum anti-GI,
t correspondent probablement,
certains des composants non-
pécifiques de l'antigène, qui
'ont pas été entièrement éli-
inés par l'adsorption du sérum.

L'antigène AI présente
fig. 9), au contrôle électropho-
étique sur papier le spot net
le l'albumine et une trace dans
a région des alpha-globulines
traînée sur le parcours de la-
quelle on constate dans certaines
préparations, une légère inten-
ification dans la position des
lpha$_2$-globulines). L'électropho-
èse en gel donne l'image d'une
raction pure, parfois suivie
'une traînée très peu intense,
ans la région de l'alpha-globu-
ine. Par analyse immuno-élec-

IMMUNO-ÉLECTROPHORÈSE EFFECTUÉE AVEC LES ANTIGÈNES ET LES ANTI-SÉRUMS HOMOLOGUES ET HÉTÉROLOGUES ADSORBÉS ET NON-ADSORBÉS EN PROPORTION CORRESPONDANT AU TITRE PRÉCIPITANT OPTIME

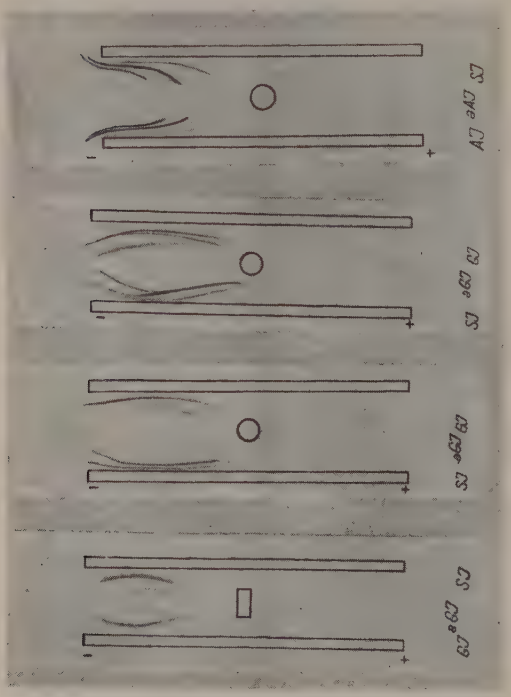


Photographie 10.

SI — Sérum immun total; GI = globuline immune; AI — albumine immune; aSI — Sérum anti-sérum immun total; aSI ads. — Sérum anti-sérum immun total adsorbé avec SI; aGI — sérum anti-globuline immune; aGI ads — sérum anti-globuline immune adsorbé avec GI; aAI — sérum anti-albumine immune; aAI ads — sérum anti-albumine immune adsorbé avec AI

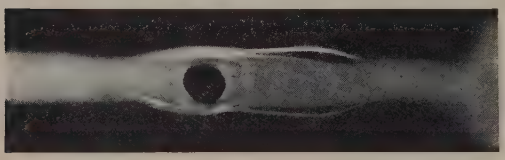
Photographie 11. — Système SN (sérum normal total) et anti-sérum normal total.

IMMUNO — ÉLECTROPHORÈSE DES ANTI-SÉRUMS ET DES ANTIGÈNES SUIVANTS:



Photographie 12

SI — Sérum immun total; GI — globuline immune; AI — albumine immune; aSI — sérum anti-sérum immun total; aGI sérum anti-globuline immune; aAI sérum anti-albumine immune



Photographie 13

Globuline immune; Sérum anti-globuline immune. Sérum anti-sérum immun total;

trophorétique, on constate (fig. 10, images d et e) que l'albumine immune (AI), soumise à l'électrophorèse, précipite avec le sérum anti-AI, diffusé ultérieurement, donnant lieu à l'apparition d'une seule ligne intense de précipitation dans la position de l'albumine, une seconde ligne, d'intensité très réduite, dans la position des alpha$_1$-globulines et 2 lignes (dont l'une très faible) dans la position des alpha$_2$-globulines (fig. 10 d).

Dans la réaction avec le sérum correspondant adsorbé, l'albumine immune présente une seule ligne de précipitation relativement intense dans la position des alpha$_2$-globulines. Dans toutes les expériences, les réactions entre l'antigène AI-sérum anti-AI ont donné les précipitations les plus rapides.

A l'aide de quantités plus grandes d'antigènes, on obtient des images pareilles à celles de la fig. 10 image e. Les lignes de précipitation sont plus intenses et l'on constate de nouvelles lignes de précipitation; après élimination des lignes de précipitation non-spécifiques avec le sérum adsorbé, les images se superposent de manière satisfaisante.

Si après séparation par migration électrophorétique, le sérum anti-GI réagit avec les antigènes SI et GI, diffusés ultérieurement (en quantité équivalente à celles de l'anti-sérum), on constate l'apparition de lignes de précipitation presque similaires comme nombre et intensité, dans la position correspondant aux gamma-globulines du sérum anti-GI (fig. 12-a). De même, AI et SI précipitent avec les gamma-globulines du sérum anti-AI (fig. 12d).

Des résultats semblables sont obtenus lorsqu'on utilise des quantités d'antigènes doubles ou triples (fig. 12 b.c.).

Si les composants du sérum anti-AN (fractionné par migration électrophorétique) réagissent avec les antigènes SN, AN ou GN diffusés ultérieurement, on obtient toujours des lignes de précipitation dans la position des gamma-globulines.

De l'ensemble d'examens pratiqués à l'aide de l'analyse immuno-électrophorétique, il résulte que dans le cas du sérum total utilisé comme antigène, il s'agit d'un complexe antigénique, dont chaque composant posséderait ses propres groupements, qui impriment ou génèrent dans l'immuno-sérum de lapin, des anticorps différents du point de vue qualité et quantité.

Par rapport aux sérums de chèvre normaux et anti-pertussis, les anti-sérums de lapin contiennent des anticorps pour tous les composants protéiques des sérums, normaux et immuns, ainsi que pour les fractions isolées de ces sérums. L'épuisement des anti-sérums avec les antigènes homologues (dans la zone de l'équivalence) élimine les anticorps spécifiques.

En ce qui concerne l'intensité et la vitesse de l'apparition des lignes de précipitation, on constate l'apparition la plus rapide dans les systèmes AI-sérum anti-AI, ce qui s'expliquerait, soit par le fait que, possédant un poids moléculaire plus petit et une solubilité plus grande que les globulines, l'albumine serait plus rapidement diffusée, soit par le fait qu'elle a un pouvoir antigénique supérieur. Avec le sérum normal et les fractions isolées de ce dernier, les précipitations sont plus lentes et les lignes de précipitation parfois moins intenses. D'ailleurs, le lapin donne des anticorps très sensibles et spécifiques envers l'albumine, alors que la réponse vis-à-vis des globulines, est variable (25 c).

Les anticorps précipitants de tous les anti-sérums de lapin étudiés ont été mis en évidence dans la fraction gamma-globulinique — ainsi qu'il a été démontré par de nombreuses recherches (8, 11, 13, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 26) — bien que la présence des anticorps envers la tuberculine ait été mentionnée dans la fraction alpha-globulinique.

Dans les réactions entre les sérums de chèvre totaux, normaux et immuns anti-pertussis (SN et SI), ainsi qu'entre les fractions protéiques isolées de ces derniers (AN, GN, AI, GI) avec les anti-sérums respectifs, préparés sur le lapin, on a constaté des réactions croisées. COOMBS et MOURANT (4) ont démontré par des tests de précipitation, que les anti-sérums préparés avec diverses fractions protéiques du sérum humain, ne sont pas strictement spécifiques pour les fractions respectives. A part les réactions croisées, la pluralité des lignes de précipitation — mises en évidence par les réactions de précipitation en gel — témoigne de l'hétérogénéité des fractions sériques. La nature chimique et la configuration stérique des groupements déterminants de la molécule d'antigène, les modifications dues aux techniques de fractionnement, l'existence d'une série entière de globulines dans les sérums immuns, allant des globulines « normales » jusqu'au globulines « anticorps », ainsi que la voie et la durée de l'immunisation, représenteraient quelques uns des élements dont il faut tenir compte dans l'interprétation de l'apparition des lignes multiples de précipitation (1, 3, 13, 20, 26, 28). L'hétérogénéité du matériel antigénique, la pluralité des facteurs déterminants ou bien l'affinité différente des anticorps vis-à-vis d'un même déterminant antigénique constituent l'objet de nos études présentes. Les réactions de précipitation ont toutefois permis l'identification d'un composant « dominant » pour chaque fraction, qui s'impose tant par l'intensité de la réaction de précipitation, que par la disparition de la réaction après l'absorption spécifique (25c).

Dans un travail antérieur (9), nous avons montré que les antigènes employés dans la préparation du sérum anti-pertussis de chèvre étaient représentés par

des germes totaux, endotoxine brute et d'antigènes de surface, — facilement diffusibles. Tous les antigènes réagissent tant avec le sérum immun, qu'avec la globuline isolée de ce dernier. Les anticorps générés par les germes totaux et par les antigènes facilement diffusibles, se sont manifestés par l'apparition des lignes de précipitation dans la région des gamma$_2$-globulines, alors que l'endotoxine détermine en plus l'apparition des lignes de précipitation aussi dans la région des bêta-globulines (ou gamma-globulines rapides). Nous avons constaté que la toxine diphtérique purifiée*) précipitait avec le sérum antitoxine diphtérique, préparé sur le cheval, présentant des lignes de précipitation dans la même position, l'intensité et l'étendue de la précipitation étant, dans ce cas, plus grande.

Selon cette observation, corroborée avec les données concernant l'existence d'une fraction T, dans le sérum antidiphtérique de cheval (19, 8, 15, 16, 17), il existerait dans le sérum mixte anti-pertussis de chèvre, ainsi que dans les gamma-globulines obtenues de celui-ci, en plus des anticorps anti-microbiens, des anticorps antitoxiques (du type antitoxine diphtérique T). (1, 10).

Les divers antigènes et anti-sérums utilisés par nous, ainsi que la sensibilité des réactions dans l'analyse immunochimique, nous ont permis de constater que l'on obtient des réactions croisées, lorsqu'on utilise comme réactifs des protéines d'espèces différentes, ou qui varient dans le cadre de la même espèce. Elles indiqueraient — plus qu'une parenté immunologique — voire une identité absolue d'un ou plusieurs groupements déterminants des antigènes respectifs (14).

CONCLUSIONS:

Dans le présent travail sont exposés les résultats de l'étude immunochimique des sérums de chèvre normaux et anti-pertussis, ainsi que l'étude des fractions gamma-globuline et albumine, isolées de ces derniers.

Ces composants ont été utilisés, tant comme réactifs dans les réactions immunochimiques, que pour la préparation des anti-sérums correspondants sur le lapin. Pour l'interprétation des réactions de précipitation, on a utilisé comparativement, les anti-sérums totaux et après leur absorption par les antigènes homologues dans la zone de précipitation optime.

Dans les réactions de diffusion en gel des divers antigènes avec les sérums totaux et adsorbés, homologues et hétérologues, on a constaté l'apparition d'une pluralité de lignes de précipitation, spécifiques et non-spécifiques. En éliminant les lignes de précipitation, partiellement ou entièrement identiques aux lignes données par d'autres systèmes et après élimination des lignes persistant dans les réactions des antigènes avec les anti-sérums adsorbés, on a mis en évidence, dans les fractions isolées des sérums de chèvre, normaux et anti-pertussis, l'existence d'une seule ligne spécifique dominante, pour chaque fraction,

A l'aide de l'analyse immuno-électrophorétique, on a mis en évidence dans le sérum immun de chèvre, en présence de l'anti-sérum de lapin, 12 fractions protéiques. Dans le sérum normal on a trouvé les mêmes composants, à l'exception de celui qui se trouve dans la position d'une gamma-globuline rapide (soit d'une bêta-globuline lente ou d'une fraction semblable au constituant

*) Travail effectué en collaboration avec G. Calalb, A. Saragea et P. Maximesco (non-publié.).

T du sérum anti-diphtérique). Les gamma-globulines et les albumines isolées les sérums de chèvre normaux et anti-pertussis, ont présenté, dans les réactions vec les anti-sérums correspondants de lapin, des lignes de précipitation (spéifiques et non-spécifiques), dont les lignes de précipitation spécifiques et domiıantes ont pu être différenciées à l'aide des anti-sérums épuisés par adsorption pécifique.

Dans les sérums de lapin, les anticorps (antiglobulines et anti-albumines) e trouvent localisés dans les gamma-globulines.

On discute la pluralité des lignes de précipitation, ainsi que les réactions roisées, dont l'apparition a été constatée entre les antigènes et les antiérums utilisés, par rapport aux données existantes sur l'hétérogénéité immuıologique.

Nous exprimons notre reconnaissance à Mlle Dr. Aristia Dâmboviceanu, Chef de la Section d'Immuno-Chimie de l'Institut Dr. I. Cantacuzino, pour ses conseils précieux, ainsi qu'au Conf. Dr. N. Pozsgi, Chef de la Section B. Pertussis de l'Institut Dr. I. Cantacuzino, pour l'appui accordé au cours de nos travaux.

Nous remercions également Mr. V. Ganea, Chef du Laboratoire de «Photographie scientifique» et Mr. M. Poiană, dessinateur technique, pour la collaboration et l'exécution des photographies et lavis présentés dans nos travaux.

BIBLIOGRAPHIE

1. Babaeva S. N. et Podolskaia A. A. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol, 1956, No.4, 7.
2. Campbell H. D. — Fortsch. Chem. Org. Naturstoffe 1952, **9**, 443.
3. Campbell H. D. et Lanni F. cité par Greenberg M. D. — Aminoacids and proteins 1951, p. 649.
4. Cistovici G. N. — Jurn Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1955, No. 11, 78.
5. Courcon J. et Uriel J. — Ann. Biol. Clin., 1958, **3**—**4**, 181.
6. Coombs R. R. A. et Mourant A. E. — J. Path. a Bact., 1947, **59**, 105.
7. Dean et Webb — J. Path. Bact., 1926, **29**, 473.
8. Deutsch H. F. et Nichol J. C. — J. Biol. Chem., 1948, **176**, 797.
9. Andreesco-Ţigoiu et Vainer H. — Archiv. Roum. de Path. exp. et de microbiologie, 1960, **19**, 19.
10. Grabar P. — Behringwerke Mitteil, 1955, **30**, 23.
11. Grabar P. et Williams C. A. — Biochem., Biophys. Acta., 1953, **10** 193.
12. Kaminski M. — J. Immunol., 1955, **75**, 367.
13. Macheboeuf M. cité par Polonovski M. — Pathologie biochimique, Paris. Ed. Masson 1952.
14. Ouchterlony O. — Atti del VI Congr. Intern. di Microbiol. Roma 1953, J. Immunol., 1956, **77**, 324, 119; 1957, **78**, 172; Ann. Inst. Pasteur 1955, **89**, 531.
15. Schultze E. H. et Schwick G. — Behringwerke Mitteil., 1957, **33**, 11.
16. Scheidegger J. J. et Buzzi C. — Rev. franc. d'études chimiques et biol. 1957, II/9, 895.
17. Schultze H. E., Schonenberger M. et Matheka H. D. — Behringwerke Mitteil. 1952, **26**, **21**.
18. Seibert F. B. et Nelson E. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1942, **49**, 77.
19. Scheer van der J. et Wyckoff R. W. G. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1940, **43**, 427.
20. Schultze H. E. — Angewandte Chemie, 1954, **66**, 396.
21. Tiselius A. et Kabat A. E. — J. Exp. Med. 1939., **69**, 119.
22. Uriel J. et Scheidegger G. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, **37**, 165.
23. Uriel J., Fine M. J., Courcon J. et Le bourdelle F. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1957, **39**, 1415.
24. Vainer H. et Andreesco-Ţigoiu V. — Archiv. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1960, **19**, 29.
25. Wunderly Ch., — Behringwerke Mitteil, 1958, **34**, 81.
26. Williams W. J. — Fortsch. Chem. Org. Naturstoffe 1952, **7**, 27.
27. Williams A. C. et Grabar P. — J. Immunol., 1955, **74**, 404, 158, 397.
28. Wilson M. M. et Pringle H. P. — J. Immunol. 1904, **75**, 232.

ХИМИЧЕСКОЕ, ИММУННОХИМИЧЕСКОЕ И БИОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ КОЗЬЕЙ ПРОТИВОКОКЛЮШНОЙ СЫВОРОТКИ

Сообщение III. АНАЛИЗ ПРИ ПОМОЩИ ДИФФУЗИИ И ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ГЕЛЕ, КОЗЬЕЙ НОРМАЛЬНОЙ И ИММУННОЙ СЫВОРОТКИ И ГАММА-ГЛОБУЛИНОВ И АЛЬБУМИНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЭТИХ СЫВОРОТОК

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В порядке изучения физических и иммунохимических свойств цельных сывороток и очищенных и концентрированных сывороточных фракций этих сывороток, в данной статье анализируются эти составные части при помощи метода двойной диффузии и электрофореза.

В качестве антигенов применяли:

Нормальную козью сыворотку

Нормальный гамма-глобулин

Нормальный альбумин

Противококлюшную козью сыворотку.

Противококлюшный гамма-глобулин.

Альбумин противококлюшной сыворотки

При помощи этих антигенов получены сыворотки на кроликах.

Затем были приготовлены сыворотки истощенные гомологичными антигенами (в зоне максимальной преципитации, с исследованием надосадочных жидкостей на присутствие антигена и антитела).

Таким образом, были получены следующие реактивы:

Кроликовая сыворотка против нормальной козьей сыворотки

Кроликовая сыворотка против нормального глобулина:

Кроликовая сыворотка протиь нормального альбумина

Кроликовая сыворотка против иммунной козьей сыворотки

Кроликовая сыворотка против иммунного глобулина

Кроликовая сыворотка против иммунного альбумина

Кроликовая сыворотка против нормальной козьей сыворотки истощенная нормальной козьей сывороткой

Кроликовая сыворотка против нормального глобулина, истощенная нормальным глобулином

Кроликовая сыворотка против нормального альбумина, истощенная нормальным альбумином

Кроликовая сыворотка против иммунной козьей сыворотки, истощенная иммунной козьей сывороткой.

Кроликовая сыворотка против иммунного глобулина, истощенная иммунным глобулином

Кроликовая сыворотка против имунного альбумина, истощенная иммунным альбумином

Эти 18 иммуннохимических реактивов были использованы в реакциях преципитации в геле и в иммуноэлектрофорезе, как в гомологичных сочетаниях, так и в гетерологичных.

Анализ полученных результатов- в различных условиях работы детально описанных — дал возможность формулировать следующие выводы:

Реакции диффузии в геле выявили множественные линии преципитации, специфической и неспецифической природы. Путем исключения неспецифических линий преципитации при помощи результатов, полученных в реакциях с истощенными сыворотками, удалось выявить для каждого антигена присутствие специфической и преобладающей линии преципитации.

При помощи электрофореза были также выявлены и дифференцированы специфические линии преципитации от неспецифических и установлено, что в кроличьих сыворотках антитела против альбуминов и против глобулинов локализуются в гамма-глобулинах. Установлено также, что в козьей смешанной противококлюшной сыворотке, также как и в гамма — глобулинах, выделенных из последней, находятся кроме антимикробных антител и антитоксические антитела (вроде дифтерийных актитоксинов, фракция Т).

В дальнейших работах мы представим новые наблюдения и данные, касающиеся строения и биохимических и иммунохимических свойств противококлюшного гамма — глобулина.

CHEMISCHE, IMMUNCHEMISCHE UND BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER ANTIPERTUSSIS-ZIEGENSERUM

-te Mitteilung. DIE ANALYSE DER NORMAL- UND IMMUNSERA VON ZIEGEN, SOWIE DER AUS IHNEN ISOLIERTEN GAMMAGLOBULINE UND ALBUMINE MIT HILFE DER DIFFUSION UND IMMUNOELEKTROPHORESE IN GELEN

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der Untersuchung der immunphysikalischen und chemischen Eigenschaften er Totalsera und der aus ihnen isolierten, gereinigten und konzentrierten Fraktionen, werden n der vorliegenden Mitteilung diese Komponenten durch die Methode der doppelten Diffusion h Agar und der Immunoelektrophorese analysiert.

Als Antigene wurden verwendet:

Normales Ziegenserum, normales Gammaglobulin, normales Albumin.

Antipertussis-Ziegenserum; Antipertussis-Gammaglobulin; Albumin aus Antipertussisserum.

Mit diesen Antigenen wurden von Kaninchen Antisera gewonnen, welch letztere zur Herstellung von mit den homologen Antigenen absorbierten Sera verwendet wurden (Absorption im Punkte maximaler Präzipitation, bei Prüfung der überstehenden Flüssigkeit auf die Anwesenheit von Antigen und Antikörper).

Auf diese Weise wurden folgende Reagentien erhalten:

Kaninchenimmunserum gegen normales Ziegenserum,
Kaninchenimmunserum gegen normales Globulin,
Kaninchenimmunserum gegen normales Albumin,
Kaninchenimmunserum gegen Ziegenimmunserum,
Kaninchenimmunserum gegen Immunglobulin,
Kaninchenimmunserum gegen Immunalbumin,
Kaninchenimmunserum gegen normales Ziegenserum, absorbiert mit normalem Ziegenserum,
Kaninchenimmunserum gegen normales Globulin, absorbiert mit normalem Globulin,
Kaninchenimmunserum gegen normales Albumin, absorbiert mit normalem Albumin,
Kaninchenimmunserum gegen Ziegenimmunserum, absorbiert mit Ziegenimmunserum,
Kaninchenimmunserum gegen Immunglobulin, absorbiert mit Immunglobulin,
Kaninchenimmunserum gegen Immunalbumin, absorbiert mit Immunalbumin.

Diese 18 immunchemischen Reagentien wurden sowohl homolog als auch heterolog in Präzipitationsreaktionen in Agar und in der Immunoelektrophorese angesetzt.

Eine Analyse der unter verschiedenen, im Einzelnen beschriebenen Arbeitsbedingungen erhaltenen Ergebnisse führte zur Formulierung folgender Schlüsse:

Bei den Diffusionsreaktionen in Agar treten multiple, spezifische und unspezifische Präzipitationslinien auf. Durch Ausscheidung der unspezifischen Präzipitationslinien, auf Grund der in den Reaktionen mit adsorbierten Sera erhaltenen Resultate, gelang es für jedes Antigen eine spezifische und dominante Präzipitationslinie nachzuweisen.

Auch durch Immunoelektrophorese gelang es spezifische und unspezifische Präzipitationslinien nachzuweisen und zu unterscheiden, wobei sich ergab, dass im Kaninchenserum die gegen Albumin und Globulin gerichteten Antikörper in den Gammaglobulinen lokalisiert sind. Ausserdem ergibt sich, dass sowohl im Antipertussismischserum der Ziege als auch in den daraus isolierten Gammaglobulinen, neben antimikrobiellen auch antitoxische Antikörper vorhanden sind (vom Typus des Diphtherieantitoxins, T-Fraktion).

In künftigen Arbeiten werden wir neue Beobachtungen und Daten bezüglich der Struktur und der biochemischen und immunchemischen Eigenschaften des Antipertussisgammaglobulins vorlegen.

A CHEMICAL, IMMUNOCHEMICAL, AND BIOLOGICAL STUDY OF ANTI-PERTUSSIS GOAT SERUM

ird Note. AN ANALYSIS OF NORMAL AND OF IMMUNE GOAT SERA AS WELL AS OF THE GAMMA-GLOBULINS AND ALBUMINS ISOLATED FROM THEM BY DIFFUSION AND IMMUNOELECTROPHORESIS IN GELS

SUMMARY

Within the framework of a study concerning the physical and immunochemical properties of whole sera and of the purified and concentrated serum fractions obtained from them, the respective reagents were analysed by the method of double diffusion in gels and by immunoelectrophoresis.

The following antigens were used:
Normal goat serum.
Normal gamma-globulin.
Normal albumin.
Anti-pertussis goat serum.
Anti-pertussis gamma-globulin.
Albumin from anti-pertussis serum.

Antisera were prepared in rabbits by means of these antigens (at the point of maximal precipitation, the supernatants being tested for the presence of antigen or antibody)

The following reagents were thus obtained:
Serum against normal goat serum.
Serum against normal globulin.
Serum against normal albumin.
Serum against immune goat serum.
Serum against immune globulin.
Serum against immune albumin.
Serum against normal goat serum, adsorbed with normal goat serum.
Serum against normal globulin, adsorbed with normal globulin.
Serum against normal albumin, adsorbed with normal albumin.
Serum against immune goat serum, adsorbed with immune goat serum.
Serum against immune globulin, adsorbed with immune globulin.
Serum against immune albumin, adsorbed with immune albumin.

These 18 immunochemical reagents were used in precipitin reactions in gels and for immunoelectrophoresis, in homologous as well asinheterologous patterns.

An analysis of the results obtained in various conditions (as detailed above) led to the following conclusions:

Multiple, specific and non-specific lines of precipitation were found to appear in diffusion reactions in gels. By eliminating the non-specific precipitation lines on the basis of results obtained in reactions with adsorbed sera, it has been possible to demonstrate the existence of a specific and dominant precipitation line for each single antigen.

Specific and non-specific precipitation lines could be demonstrated and distinguished by immunoelectrophoresis as well. Anti-albumin and anti-globulin antibodies in rabbit sera were found to be contained in the gamma-globulin fraction. Besides antimicrobial antibodies, mixed anti-pertussis goat serum and gamma-globulins isolated from it appear to contain antitoxic antibodies as well (of the diphtheria antitoxin type, T fraction).

In subsequent papers further data concerning the structure and biochemical and immunochemical properties of anti-pertussis gamma-globulin will be reported.

ÉCO-SYSTÈMES «PHAGE BACTÉRIE» ET FORMES DE «VARIATION» DE 565 SOUCHES DE *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE* — D'ORIGINE ÉPIDÉMIQUE. DISTRIBUTION DES DIFFÉRENTS TYPES.

par

M. Ciucă, G. Calalb, Alice Saragea, Paula Maximesco, Ecaterina Stanică, T. Ieremia, Alexandra Ţupa, Eugenia Meitert et Cecilia Stoian

Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Centre National de Bactériophages-Références et Service de la Diphtérie, avec la collaboration du Centre Sanitaire Antiépidémique de Cluj) *)

— Manuscrit reçu le 16 juin 1959 —

Les progrès scientifiques enregistrés pendant cette décade en matière de *physiologie microbienne* et de mécanisme du « *potentiel de variation* » des germes pathogènes sous l'action du phage — en tant qu'agent inducteur de variation —, marquent une nouvelle « étape méthodologique » d'une importance capitale pour les études biologiques de « *l'écologie des microorganismes* » en général et du *Corynebacterium diphtheriae* en particulier.

Au 7-e Symposium de la Soc. gén. de Microbiologie (1957), E. S. Anderson, en faisant le point des résultats acquis sur le rôle et l'importance du phage dans l'écologie de la cellule hôte, affirme la capacité du phage de contrôler la toxigénèse de *Corynebacterium diphtheriae* et d'assurer le transfert de caractères génétiques de la cellule donatrice à la cellule réceptive: « réel procès biologique de conversion à virulence et toxigénèse d'un germe avirulent et non toxigène ».

Il suggère — d'accord avec Shepherd, Hewitt, Wilson, etc. — la continuation des recherches, afin d'acquérir de nouveaux faits en ce qui concerne les suivants problèmes:

— si la « conversion » est un fait commun en conditions naturelles;

— quel est le mécanisme du procès biologique de la lysogénéisation « in vivo »;

— si la toxigénèse coexiste avec la lysogénie et si toutes les souches toxigènes sont en symbiose avec le phage;

— quelles sont la capacité et les limites du phage diphtérique de déterminer la toxinogénèse et si les phages d'autres germes sont adaptables au *Corynebacterium diphtheriae*, etc., etc.

Dans ce domaine, les recherches effectuées par Freeman (7) (1951), Hewitt (12), Groman (10, 11); Parsons et Frobisher (15), Pappenheimer (14); Narbutowicz (13), Svet Moldavski (16, 17), Christensen (6), Boyd (2), M. Ciucă et coll. (4, 5), ainsi que les mémoires présentés aux discussions des Symposiums — III, V et VI — par Shepherd, Hewitt, Anderson, Wilson, etc., apportent

*) S. Băiţan, V. Coban, Sanda Iurasog, Voichiţa Jula, I. Lenghel, Zoiţa Marcou, V. Nica, D. Sasu.

des contributions scientifiques fondamentales, d'une valeur indéniable, au problème des « modifications radicales du métabolisme » de la cellule bactérienne en symbiose avec le phage et dont les conséquences sur la pathogénèse « en clinique et en épidémiologie » paraissent déterminantes dans l'évolution écologique des types de *Corynebacterium diphtheriae*.

★

En continuant nos recherches antérieures dans ce domaine (4, 5), il nous a semblé utile d'étudier:

— dans quelle mesure les facteurs écologiques de milieu — y compris les bactériophages — à rôle déterminant dans le « phénomène lysogénie » — pourraient influencer l'évolution et la distribution locale des « types » de *C. diphtheriae* au cours d'une longue période (3 à 5 ans) dans un pays comme le nôtre, où l'introduction de la vaccination préventive obligatoire des enfants (à partir de 1934/1936) a réalisé une *forte réduction de la morbidité* — variant de 4.5 à 6.3.‰ — et une *baisse de la mortalité* de 0,3 à 0,4‰. —

L'apparition de cas sporadiques et de microfoyers de diphtérie est surtout due aux fuites, qui dépassent 30%, de la vaccination et revaccination complète. Cependant, il nous semble utile de rappeler certains aspects épidémiologiques de la diphtérie — parmi les enfants vaccinés et revaccinés — dans la plupart des pays et particulièrement l'épidémie de diphtérie maligne de Baltimore signalée par Frobisher (8) et d'insister une fois de plus sur la nécessité de nouvelles études: *a)* sur le complexe *écologique* des *Corynebacteria*, ainsi que sur le potentiel physiologique de variation du *C. diphtheriae*, jusqu'au phénomène de « *conversion* » induit par le phage diphtérique spécifique ou même des phages hétérologues; *b)* sur les facteurs écologiques d'interférence de l'organisme au cours de l'infection et la réactivité immunologique.

★

Nous nous sommes donc proposés d'étudier les cultures « pures » obtenues des cas de diphtérie et à contrôler les porteurs de germes, du point de vue du complexe des facteurs écologiques immédiats de milieu, et essayer — par cela même — d'établir, éventuellement, leurs interrelations avec le microorganisme « considéré comme un entier », ainsi que les modifications ultérieures possibles de ces rapports.

Dans ce but, nous avons associé à l'étude du complexe des « caractères biologiques » de 565 souches de *C. diphtheriae*, isolées pendant trois années de suite, des recherches sur les facteurs écologiques de milieu, y compris la microflore, le comportement envers le bactériophage et, éventuellement, la présence de souches *lysogènes* homologues ou hétérologues.

A. *Matériel biologique et méthodes.* Sur un total de 565 souches de C. diphtheriae étudiées:

— 243 avaient été isolées de *cas cliniques*;

— 192 de *porteurs de germes sains* (contacts dans les microfoyers épidémiques — ou cas sporadiques);

— 130 porteurs sains de germes dépistés au cours des *opérations de sondage* « en masse » dans des collectivités d'enfants.

La conservation des souches a été effectuée « en souscultures sur milieu öffler » — repiquées une fois par mois.

La technique d'identification des espèces et des types s'adressait au omplexe des caractères du germe:

1) caractères morphologiques;

2) caractères de culture sur différents milieux: Loeffler, bouillon Martin, lauberg, Gundel-Tietz;

3) (*a*) test du métabolisme: par la méthode de la fermentation des hydro-arbonés (glucose, saccharose, lévulose, maltose, dextrine, amidon, glycogène)

(*b*) tests: H_2S, hémolyse/globules lapin;

(*c*) phosphatase, uréase;

(*d*) test *toxinogénèse :* « in vitro » Elek Ouchterlony, « in vivo » -cobayes ar voie sous-cutanée; détermination de la D.M.M.

(*e*) test/*lysogénie* des cultures en bouillon de 6—24—48 heures sur ouches « indicatrices » lysosensibles « standard »: 1174, 1180, 710, 411, 444 - Freeman — 25 Varsovie; souches lysosensibles indigènes: 338, 431.

(*f*) test/*lysosensibilité* des cultures de 2 h. soumises à l'action:

— des spécimens de phages diphtériques « standard »: B. Freeman; 25 arsovie; et

— phages lytiques « d'origine souches lysogènes locales ».

Les méthodes d'étude des « éco-systèmes » ont été décrites en détail dans es communications antérieures (4).

B. Les études analytiques, par régions, d'origine des foyers de diphtérie omportaient également:

— la distribution géographique des « types »; la fréquence de types prédomi-ants (par certaines régions); des études sur la structure antigénique des souches;

— l'incidence comparée de la *toxigénèse* et la *lysogénie* des souches par apport au « type » de C. diphtheriae;

— les particularités de *lysosensibilité* des souches et le mécanisme de la résistance ctive aux « spécimens » de phages indiqués ci-dessus; rapports entre la lyso-ésistance et la toxinogénèse (v. tableau).

★

Résultats acquis:

I. 1957: *Région C. microfoyer de diphtérie F.* parmi les enfants vaccinés u « partiellement vaccinés »:

— Sur 59 *souches :* — 41 de type mitis et 18 intermedius de C. diph-heriae étudiées, 5 cas cliniques et 54 porteurs de germes/contacts;

La grande majorité des souches « R » *variante chromogène — jaunâtre ».*

Toxinogénèse — sur 28 souches toxigènes:

— 21 appartenaient au « type *mitis* » et 7 au type « *intermedius* »

le reste de 31 sur 59 étaient non-toxigènes.

Ec. s. Ph. Cd. Tests: *lysosensibilité, lysorésistance, lysogénie.*

a) sur 41 souches « mitis »:

30 lysosensibles;

10 lysorésistantes (non-lysogènes);

1 lysogène et résistante;

b) les 18 souches « intermedius »: — toutes lysorésistantes (et non -lysogènes).

Formes cliniques bénignes de diphtérie à type mitis ou intermedius dont 47,6% des souches étaient toxigènes et lysogènes et 58% lysosensibles.

1958: au mois de décembre trois microfoyers: T., A., H. — localités sans communication directe avec le foyer F — « exclusivement à type gravis » parmi les enfants non-vaccinés:

— 66 souches isolées, *toutes* toxigènes, lysogènes et lysorésistantes

— vaccination au P.T.A.P. « en masse » de plus de 90% des enfants.

Formes cliniques sévères — quelques cas létaux.

1959: Deux mois après la vaccination « primaire » et traitement des porteurs de germes avec de la pénicilline et nitrofuran, on effectue le *contrôle par «sondage »* et on isole 39 souches de type mitis et intermedius « R » « *chromogènes/jaune-orange-lysorésistantes et non-lysogènes*, n'excluant pas l'hypothèse d'un procès de variation à la suite du contact avec le phage, d'autant plus que « sept sur 39 souches lysorésistantes étaient également toxigènes », donc une forte réduction de l'incidence de souches toxigènes.

On se demande si ce « changement » de distribution des types de C. diphtheriae — dans une même population infantile — avec virage du type gravis « lysogène et résistant » aux types mitis et intermedius « non-lysogènes et résistants » ne serait dû à un processus de « transduction » de certains caractères, fréquemment constatés, chez d'autres germes, comme suite du procès de symbiose avec le phage ».

II. *Région S. Ville S.* Des cas sporadiques de diphtérie avaient été signalés de 1956 à 1958 parmi les enfants vaccinés; un pourcentage d'enfants n'étaient pas encore vaccinés.

1956 (*a*) Sur 29 *souches* de Cd. (enfants pour la plupart non-vaccinés): 8 provenaient de cas cliniques et 21 des porteurs/contacts

— 26 (89,9%) de *type gravis* étaient *toxigènes et lysorésistantes*, la lysogénie n'étant évidente que pour 6 des souches toxigènes signalées.

— 3 souches (10,10%) de *type mitis*, non-toxigènes étaient lysorésistantes et non-lysogènes.

1957 (*b*) sur 41 *souches* de Cd. isolées:

— 21 de *type gravis* (51,21%), dont 20 souches lysorésistantes, 17 étant en même temps lysogènes: 1 souche lysosensible;

— sur 9 souches *lysorésistantes* de type intermedius (21,94%): 4 étaient également lysogènes;

— sur 11 souches *type mitis* (26,82%), toutes lysorésistantes: 4 étaient également *lysogènes.*

Test-toxigénèse :

— sur le total de 41 souches 28 sont « *toxigènes* » (68.2%) appartenant respectivement:

— au type gravis: 51,21%

— au type mitis: 16,99%

1958. Sur un total de 45 souches isolées, voire 20 de type gravis 57,7%, 3 intermedius (6,8%) et 16 mitis (35,5%) — les études des « systèmes phage-bactérie », effectuées sur 40 *de ces souches*, ont montré une *lysorésistance* de 100%, 31 sur 40 étant en même temps *lysogènes* (77,5%). — Sur un total de 45, 35 (77,7%) sont *toxigènes* — respectivement 57,7% gravis, 20% mitis, 20% intermedius — « donc: un taux de *toxinogénèse* (77,7%) dépassant de très peu le taux de *lysogénie* (70,5%), attribué respectivement:

Tableau récapitulatif

Région. Foyer	Souches isolées en	Nombre de souches	Type des souches						Toxigènes		Rapports phago-bactériens						Provenance		Observations concernant les souches	Observations concernant les macroorganismes
			Gravis		Mitis		Intermedius				Lysorésist.		Lysosensib.		Lysogènes					
			Nombre	Taux %	Nombre	Taux %	Nombre	Taux %	Nombre	Taux %	Nombre	Taux %	Nombre	Taux %	Nombre	Taux %	Malades	Entourage ou contacts		
Région C. Foyer F. . .	1957	59	–	–	41	69.10	18	30,09	28	68,20	11	26,82	30	73,18	1		5	54 contacts	en majorité atypiques et chromogènes	vaccinés, en majorité
Foyer TAH .	1958	66	66	100,00	–	–	–	–	66	100,00	66	100,00	–	–	66	100,00	5	61 contacts		non-vaccinés
Foyer TAH .	1959	39	–	–	39	100,00	–	–	7	17,09	39	100,00	–	–	–		–	39 porteurs	en majorité atypiques et chromogènes	les anciens malades et contacts en 1958, ont été complètement vaccinés et traités avec Nitrofuran
Région S. Ville de S. .	1956	29	26	89,90	3	10,10	–	–	26	89,90	29	100,00	–	–	6	26,09	8	21 contacts		non-vaccinés
Ville de S. .	1957	41	21	51,21	11	27,59	9	21,20	28	68,20	40	97,50	1	2,50	25	60,09	14	27 contacts et porteurs		données de vaccination, inconnues
Ville de S. .	1958	45	20	57,70	16	35,50	3	6,80	35	77,70	40	100,00	–	–	31	77,50	22	23 contacts et porteurs		non-vaccinés, en majorité
Région B. et Ville de V. .	1954	3	–	–	1	–	2	–	–	–	3	-	–	–	–		3	–		
Ville de B. .	1956	25	9	36,00	11	44,00	5	20,00	18	72,00	21	100,00	–	–	14	66,66	18	7 contacts et porteurs		données de vaccination, inconnues
Id.	1957	38	15	39,40	21	55,20	2	5,40	20	52,60	37	97,30	1	2,70	10	26,30	28	10 contacts et porteurs		données de vaccination, inconnues
Id.	1958	51	7	13,72	27	52,94	17	33,25	20	38,10	48	94,12	3	5,88	10	19,80	31	20 porteurs		données de vaccination, inconnues
Id.	1959	60	56	93,30	3	5,00	1	1,70	55	91,60	60	100,00	–	–	56	93,30	5	55 contacts		56 vaccinés complètement
Région I. Ville de I. .	1955/1956	37	–	–	10	27,10	27	72,90	6	16,20	37	100,00	–	–	6	16,20	12	25 porteurs		3 vaccinés, 12 non-vaccinés pour le reste données de vaccination, inconnues
Région et Ville de P. .	1958	15	3	20,00	12	80,00	–	–	14	93,30	15	100,00	–	–	14	93,30	4	11 contacts		non-vaccinés
Ville TM. . .	1958	8	4	50,00	4	50,00	–	–	5	62,50	8	100,00	–	–	5	62,50	3	5 contacts		non-vaccinés
Ville BR. . .	1958	14	–	–	3	21,40	11	78,60	–	–	14	100,00	–	–	–		–	14 porteurs		
Ville T.O. .	1957/1958	4	–	–	4	100,00	–	–	4	100,00	4	100,00	–	–	4	100,00	–	4 porteurs		
Ville G. . .	1958	7	–	–	2	28,60	5	71,40	–	–	7	100,00	–	–	–		–	7 porteurs		
Ville Bd. . .	1958	3	3	100,00	–	–	–	–	3	100,00	3	100,00	–	–	3	100,00	3			

En plus quelques souches éparses isolées dans différentes régions du pays.

— au type gravis 57,7%;
— aux types mitis 20% et intermedius 20%,

III. *Région et ville de B.* L'étude des particularités locales des « éco-systèmes hage-bactérie » — faites sur des souches Cd. de 1954 à 1959 isolées des malades ospitalisés et des porteurs de germes/contacts — montre les faits suivants:

1954: deux souches de Cd. de type intermedius et 1 mitis étaient
— lysorésistantes, non-lysogènes et non-toxigènes.

1956: sur 25 souches de diagnostique :
— 9 gravis; 11 mitis; 5 intermedius — on constate 100% de *résistance* ; sur 25 souches étaient lysogènes; la *toxinogénèse* de 18 (sur 25 souches étu-ées) *était évidente.*

1957: sur un total de 38 souches étudiées:
— 15 de type gravis (39,4%) toutes *résistantes* dont 7 étaient également *ysogènes :*
— sur 21 souches de type mitis (55,2%) 20 étaient *lysorésistantes*: 3 étaient galement lysogènes; 1 seule de ces souches était lysosensible. Deux souches e type intermedius étaient lysorésistantes non-lysogènes.
Test *toxinogénèse :* 20 sur 38 souches étudiées (52,6%) étaient toxigènes, spectivement:
— 39,4% de type gravis; 13,2% de type mitis

1958: Sur un total de 51 souches étudiées:
— 7 de type gravis (13,72%) toutes lysorésistantes dont 3 lysogènes;
- 17 de type intermedius (33,25%) toutes lysorésistantes dont 6 lysogènes;
— 27 de type mitis (52,94%) 24 lysorésistantes, dont 1 lysogène et 3 sosensibles.
20 parmi les 51 souches (39,10%) sont toxigènes.

1959: Sur 60 souches (isolées d'un foyer fermé) à voire:
— 56 de *type gravis* étaient « *lysorésistantes et lysogènes* »
— 4 souches (d'origine cas sporadiques de diphtérie), respectivement 3 itis et 1 intermedius étaient « lysorésistantes et non-lysogènes ».

IV *Région I.* — 1955/1956. L'étude de 37 souches de Cd. montraient.
— la prévalence du type intermedius (72,9%) « toutes lysorésistantes »;
- 16,2% étaient également lysogènes et toxigènes; 31 des 37 souches lysorésistantes ne présentant pas de lysogénie.

V. *Ville et Région de P.* 1958: Sur 15 souches de Cd. dont 12 de type itis (80%);
— 11 étaient également lysogènes, toxigènes et lysorésistantes;
— 1 seule (tout en étant lysorésistante) était non-lysogène et non-toxigène.

VI *Ville de T.M.* 1958: 8 souches lysorésistantes de type gravis étaient 0% *toxigènes* et *lysogènes* ;

VII *Ville de T.O.* 1958: 4 souches de type mitis, lysogènes, toxigènes, so-résistantes.

VIII *Ville de G.* Cinq sur 7 souches lysorésistantes de Cd. intermedius étaient non-lysogènes et non-toxigènes (type intermedius)

IX *Ville de Bd.* Trois souches *lysorésistantes* de Cd. gravis étaient *toxigènes et lysogènes.*

X *Ville de Br.* 14 souches *lysorésistantes* — respectivement: — 11 intermedius et 3 mitis — « étaient non-lysogènes et non-toxigènes ».

DISCUSSION

Des études « écologiques » sur les interrelations « phage/bactérie » dans la physiologie bactérienne de 565 *souches de Corynebacterium diphtheriae*, isolées des porteurs de germes et de cas de diphtérie, apparus dans des collectivités d'enfants vaccinés ou non-vaccinés, mettent en évidence une fois de plus « l'importance méthodologique de l'écologie bactérienne associée à l'étude de la biologie du germe « en culture pure », dans le but d'établir le rôle des interactions du complexe des facteurs de milieu dans l'évolution et le mécanisme de la toxi-infection de l'organisme envahi.

Le riche matériel biologique — étudié par ces deux méthodes, — apporte une réponse à certains problèmes non-élucidés en ce qui concerne « l'importance du bactériophage dans l'écologie microbienne dans les conditions épidémiologiques « naturelles » de la toxi-infection due au Corynebacterium diphtheriae ».

La détermination de « type » de ces 565 souches — a donné:

54,70% de type gravis, 30,09% type mitis et 15,20% type intermedius, démontrant la prévalence du type gravis dans les collectivités surveillées.

Du point de vue *origine*, on a rencontré:

a) dans les cas cliniques: le type gravis— 61,30% des cas, le type mitis —20,50% et le type intermedius —18,20%.

b) chez les porteurs-contacts des malades: le type gravis — 63,50% des cas, le type mitis — 21,20% et le type intermedius — 15,30%;

c) chez les porteurs dépistés par sondage — sans relations avec les cas cliniques —: le type gravis — 26,90%, le type mitis — 47,70% et le type intermedius — 25,40%.

Bref, le type gravis est rencontré dans une proportion prédominante chez les malades et les contacts, tandis que le type mitis prédomine chez les porteurs sans relations avec le foyer épidémique.

Quant à la *toxigénèse*, 367 souches (64,10%) sont toxigènes, réparties comme suit: cas cliniques — 66,20%, porteurs/contacts — 86,60% et porteurs dépistés par sondage, seulement 25,30%. Aucune différence à noter, du point de vue de la capacité toxigénique des trois types de Cd.

En conclusion, la capacité toxigénique des souches isolées est beaucoup plus répandue parmi les souches d'origine cas cliniques et des porteurs-contacts, que parmi les souches d'origine porteurs en dehors des foyers épidémiques.

Le test de lysogénie effectué sur 527 souches par la méthode directe (sans utiliser des agents inducteurs), après 5—7 multiplications sur une souche « indicatrice » lysosensible « standard », était nettement positif dans 50,03% des cas. Parmi les souches lysogènes 91,48% étaient en même temps « lysorésistantes » vis-à-vis des spécimens de phages spécifiques « standard », et 8,52% lysosensibles.

En considérant le pourcentage assez élevé des souches lysorésistantes, on e peut exclure le rôle éventuel du contact « anamnestique » des germes avec phage inducteur chez les variantes lysorésistantes.

Quant au contrôle exercé par le phage sur la toxigénèse et ses rapports vec la lysogénie des souches étudiées, on constate un parallélisme entre la oxigénèse et la lysogénie chez 81,90% des souches étudiées. Pour le reste de 8,10% des souches lysogènes, on n'a pu mettre en évidence aucune activité oxinogénétique.

Le contrôle du « phage spécifique sur la toxigénèse » et la virulence du orynebacterium diphtheriae dans les conditions écologiques naturelles de nfection, ressort de l'analyse du « complexe des caractères biologiques » des ouches, par rapport aux facteurs écologiques et de la microflore rhino-haryngienne.

On constate des différences appréciables « d'activité métabolique » entre s souches isolées des cas cliniques et des porteurs/contacts et l'activité — en uelque sorte — plus réduite des souches isolées des porteurs sains.

Envisageant l'inégalité de la sévérité des cas cliniques, le rôle des facteurs agressifs » du germe ne paraît pas détenir une place primordiale, par rapport u facteur d'infériorité des moyens de défense et de réactivité immunologique e l'organisme, d'une part et l'interférence des facteurs écologiques de la micro-ore associée, y compris certaines particularités des « systèmes phage/bactérie » 'autre part. Rappelons, à ce sujet que certaines souches lysogènes de Cd. isolées aboraient une toxine dont le titre dépassait 1800 D.M.M. par ml.

Rien ne pourrait mieux illustrer la valeur de l'immunité dans la défense de organisme que l'exemple du « foyer épidémique » à 100% de type gravis de . ville de B. (1959) — où tous les enfants avaient subi la « vaccination complète » ous contrôle sévère, les malades présentant tous une forme clinique bénigne.

Les données citées par la littérature, ainsi que nos propres investigations ur l'importance de l'écologie « phage/bactérie » dans le procès de « *conversion* » la virulence et toxigénèse du Cd., induite par le phage spécifique ou même un hage hétérologue-staphylococcique ou entérococcique — réclament, nous sem-le-t-il, une attention toute particulière, de même que des recherches constantes ur les différents « éco-systèmes phage/bactérie » du rhino-pharynx.

Nous rappelons à ce sujet la distribution « quasi-uniforme » des types de d. dans les foyers décrits, ainsi que la prévalence — lors de l'explosion d'un icrofoyer de diphtérie — de l'un des trois types de Cd., « *identique* » au point e vue des caractères biologiques de l'espèce: — morphologie, biochimie, struc-ure antigénique, élaboration d'une toxine « unique » etc., à *l'exception des parti-ularités du comportement au phage spécifique*. Par exemple, dans l'histoire de épidémiologie (1956 - 1958) des microfoyers saisonniers de la ville de . prévalait le type *gravis toxigène et lysogène et de structure* antigénique uniforme 53,4%). Au moment de l'organisation d'un centre de récupération pour les équelles poliomyélitiques (enfants venant de toutes les régions du pays) appa-uissent des porteurs; par conséquent les souches de C. diphtheriae se mélan-ent et on observe l'apparition du type mitis. — Très probablement, parmi les nfants se trouvait un porteur de *mitis virulent et toxigène*, ou un porteur de phage libre » spécifique ou hétérologue — dont l'incidence dans un hôpital e maladies contagieuses est suffisamment fréquente (v. notre mémoire, 3), qui urait pu déterminer la « conversion » à la virulence et toxigénèse du type mitis « im-orté ». Cet exemple n'est pas le seul parmi les collectivités d'enfants contrôlées.

Rappelons le groupe de souches Cd. de la région B — 5 souches d'origine clinique et 20 souches provenant de porteurs sains/contacts, qui appartenaient à un même *type gravis toxigène et lysogène.*

Par contre, dans la ville de P., les souches de Cd. isolées de plusieurs cas sporadiques de diphtérie et d'onze porteurs de germes/contacts appartenaient à un *type mitis* toxigène et lysogène agglutinable en présence d'un sérum-immun « standard » anti-mitis.

L'influence imprimée par les facteurs écologiques dans l'épidémiologie locale est également illustrée par les particularités épidémiologiques du *microfoyer F. de la région C.* où la prévalence appartenait à une variante de Cd « chromogène », jaunâtre, à caractères mixtes; du point de vue biochimique (fermentation des sucres) se rapprochant du *type mitis* et, du point de vue aspect des colonies du *type gravis.* Cette variante chromogène lysosensible était inagglutinable par le sérum-immun « standard » anti-mitis, ce qui pose le problème de savoir si le processus de « transduction » des caractères d'un type de Cd. à l'autre ne serait dû à un facteur inducteur phagique.

Dans le but de vérifier les possibilités éventuelles de « transfert » — sans l'induction du bactériophage — des caractères d'un type de Corynebacterium diphtheriae à l'autre, de nouvelles recherches sur la lysogénéisation expérimentale nous semblent nécessaires.

Quel a été le rôle des facteurs écologiques « naturels » de la microflore y compris le bactériophage, dans l'évolution des microfoyers d'une saison épidémique à l'autre — TAH de la région C. — où l'examen en 1958 de 66 *souches isolées de type gravis toxigène et lysogène* dans 100% des cas, et qu'on ne retrouvait plus au contrôle effectué — 2 mois après une vaccination en masse (sévèrement contrôlée) de la population et le traitement des porteurs aux antibiotiques ?

« la distribution prédominante de type gravis — vérifiée en décembre 1958 — était remplacée en 1959 par une forme de variation « chromogène/jaunâtre » de Cd. de type *mitis* ou *intermedius* ainsi qu'on a pu le vérifier à l'examen de 39 souches, de type mitis ou intermedius isolées (contrôle) des porteurs de germes — *toutes lysorésistantes et non-lysogènes.*

CONCLUSIONS

Les résultats des études effectuées — pendant 3 années de suite — sur l'évolution de « 565 éco-systèmes phage — Corynebacterium diphtheriae » concernant le complexe des caractères biologiques du germe et des facteurs écologiques — microflore et réponse réactivité-organisme-hôte, mènent aux conclusions suivantes:

Le type de *Corynebacterium diphtheriae* le plus répandu pendant ces dernières années a été du type gravis; il a été isolé surtout chez les malades et les porteurs-contacts, tandis que les porteurs dépistés par sondage — hors milieu épidémique — ont fourni plus fréquemment le type mitis.

— 64,10% souches lysogènes et toxigènes du total des souches étudiées, provenaient pour la plupart des cas cliniques et porteurs-contacts; 74,7% lysorésistantes et non-lysogènes ont été isolées de porteurs-sondage ce qui n'exclut pas l'hypothèse de la sélection de « variantes lysorésistantes » sous l'action des facteurs écologiques de milieu: hôte, microorganisme, microflore (bactériophage compris).

L'importance du rôle du bactériophage dans le phénomène de « conversion » de Cd. à la lysogénie et la *toxigénèse*, ressort également de nos études sur 527 « éco-systèmes phage/bactérie », vu que des 91,48% *souches lysorésistantes*, 50,30% sont nettement lysogènes par test direct après 5 multiplications sur souche standard lysosensible.

L'importance de la lysogénie dans le mécanisme de la pathogénèse du Cd. est mise en évidence par le taux de 81,9% souches *toxigènes sur* 266 *souches nettement lysogènes*.

Les souches de Cd. isolées au cours des opérations de dépistage « en masse » — moins actives du point de vue du métabolisme — présentent certaines difficultés d'identification des formes de variation, éventuellement sélectionnées.

Les degrés de sévérité des formes cliniques de diphtérie sont déterminés tant par la pathogénité du *Corynebacterium diphtheriae* due aux « facteurs écologiques » de la microflore associée, que par le facteur « déficience » des moyens de défense naturelle de l'organisme, y compris l'absence de la réponse immunologique. L'association « en microflore » des streptocoques hémolytiques, d'entérocoques et staphylocoques pathogènes est responsable de la majorité des cas léthaux.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bordet J. et Ciuca M. — C. R. Soc. Biol., 1921, **84,** 278, 439.
2. Boyd J. S. K. — Biol. Rev., 1956, **31**, 71.
3. Calalb G., Saragea A., Ieremia T., Maximesco P., Ţupa S., Stănică E., Stoian C., Ţaga S. et Gartner M. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1959, **18,** 33.
4. Ciucă M. et coll. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1957, **16,** 153.
5. Ciucă M. et coll. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1958, **17,** 613.
6. Christensen El. — Acta Path. et Microbiol. Scand., 1957, **41,** 67.
7. Freeman V. J. — J. Bact., 1951, **61,** 675.
8. Frobisher M., Adams Jr. et Kuhns M. G. — Proc. Soc. exp. Biol. a. Med., 1945, **58,** 330.
9. Greenberg L. — Bull. O.M.S., 1955, **13,** 367.
10. Groman N. B. — J. Bact., 1953, **66,** 184.
11. Groman N. B. — J. Bact , 1955, **69,** 9.
12. Hewitt L. F. — J. Gen. Microbiol., 1952, **7,** 362.
13. Narbutowicz B. — Acta Microbiol. Polonica, 1955, **4,** 245.
14. Pappenheimer A. M. — Symposium of the Society for Gen. Microbiol., London, 1955, 40.
15. Parsons E. I. et Frobisher M. — Am. J. Public Health, 1953, **43,** 269.
16. Svet Moldavski G. I. — J. Microbiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1956, No. 4, 59.
17. Svet Moldavski G. I. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1957, No. 8, 44.
18. Tasman A. et Lansberg H. P. — Bull. O.M.S., 1957, **16,** 939.

ЭКОСИСТЕМЫ «ФАГ-БАКТЕРИЯ» И ФОРМЫ «ИЗМЕНЧИВОСТИ» У 565 ШТАММОВ ДИФТЕРИЙНОЙ ПАЛОЧКИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗНЫХ «ТИПОВ»

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Результаты исследований » проведенных в течении 3-ех лет по поведению 565 « экосистем фаг-*дифтерийная* палочка ». в отношении комплекса биологических признаков микроба и экологических факторов — микрофлора и ответнаяреактивность организма хозяина — привели к следующим выводам:

— Тип *gravis* дифтерийной палочки встречался чаще всего у больных и носителей-контактов, в то время как у носителей, распознанных по случаю выборочного обследования, выделялся чаще всего тип *mitis*

— 64, 10% лизогенных-токсигенных штаммов в общем числе изучаемых штаммов происходили в большинстве случаев от клинических больных и от носителей контактов, в то время как 74,7% штаммов, выделенных от носителей по случаю выборочного обследования оказались лизоустойчивыми и нелизогенными. Полученные данные дают повод к предположению, что отбор « лизоустойчивых вариантов » происходит под влиянием эколо-

гических факторов среды: хозяин, микроорганизм, микрофлора и бактериофаг действующих в то же время.

Из 91,48% лизоустойчивых штаммов, 50, 30% оказалось явно лизогенными. Из 266 явно лизогенных штаммов 81,9% оказались в то же время и токсигенными.

Тяжесть клинических форм дифтерии определяется как патогенностью соответствующего штамма дифтерийной палочки, зависящей от экологических факторов асоциированной микрофлоры, так и неполноценностью способов естественной защиты организма и отсутствием иммунологического ответа.

« PHAGEN-BAKTERIEN » OEKOSYSTEME UND « VARIATIONSFORMEN » BEI 565 STÄMMEN VON CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE EPIDEMISCHEN URSPRUNGS UND VERTEILUNG DER VERSCHIEDENEN « TYPEN »

ZUSAMMENFASSUNG

Die Ergebnisse von im Verlauf dreier Jahre angestellten Untersuchungen über die Entwicklung von 565 « Phagen-*C. diphtheriae*/Oekosystemen », in Rahmen des Komplexes der biologischen Merkmale des Keimes und der oekologischen Faktoren — Mikroflora und Reaktivität des Wirtsorganismus — führen zu folgenden Schlussfolgerungen:

— Im Verlauf der letzten Jahre wurde am häufigsten der *Typus gravis* von *C. diphtheriae* angetroffen. Er wurde hauptsächlich von Kranken und Trägern unter den Kontaktpersonen isoliert, während von bei Probeuntersuchungen ausserhalb des epidemischen Milieus eruierten Keimträgern, am häufigsten der *Typus mitis* isoliert wurde.

— Von der Gesamtanzahl untersuchter Stämme, stammten 64,10% der lysogenischen und toxigenischen Stämme in der Mehrzahl von klinischen Fällen und Trägern unter den Kontaktpersonen, während 77,7% der von bei Probeuntersuchungen eruierten Keimträgern isolierten Stämmen lysoresistent und nicht lysogenisch waren. Dies schliesst die Hypothese nicht aus, dass eine Auslese « lysoresistenter Varianten », unter der gleichzeitigen Einwirkung oekologischer Umweltfaktoren, wie Wirtsorganismus, Mikroorganismus, Mikroflora und Bakteriophagen, stattfindet.

Von 91,48% lysoresistentern Stämme, waren 50,30% ausgesprochen lysogen. Von 266 ausgesprochen lysogenischen Stämmen, waren 81,9% gleichzeitig auch toxigenisch.

Die Schwere klinischer Diphterieformen wird sowohl durch die Pathogenität des betreffenden Diphtheriebazillus, die auf die oekologischen Faktoren der assoziierten Mikroflora zurückzuführen ist, als auch durch die Unzulänglichkeit der natürlichen Abwehreinrichtungen des Körpers und die Abwesenheit der Immunitätsreaktion bestimmt.

« PHAGE-BACTERIUM » ECOSYSTEMS AND « FORMS OF VARIATION » IN 565 STRAINS OF CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE ISOLATED FROM EPIDEMICS. DISTRIBUTION OF THE DIFFERENT « TYPES »

SUMMARY

The results of three years' investigations on the evolution of 565 phage-*C. diphtheriae* ecosystems within the complex pattern of biological characters of the germs on the one hand, and the ecological factors — microflora and the response-reactivity of the host organism on the other hand, lead to the following conclusions:

— The *gravis* type of *C. diphtheriae* was the one most often encountered during the past few years. It was mainly isolated from patients and carrier-contacts, while in carriers detected in random check-ups — outside of epidemic environments — the *mitis* type was prevailingly isolated.

— The fact that of all the strains investigated 64.10% lysogenic-toxigenic strains were isolated for the most part from clinical cases and carrier-contacts, while 74.7% of the strains isolated from carriers in random check-ups were lysoresistant and non-lysogenic, does not exclude the hypothesis of a selection of « lysoresistant variants » occurring under the influence of environmental ecological factors: host, micro-organism, microflora, and bacteriophage at the same time.

Of 91.47% lysoresistant strains, 50,30% are definitely lysogenic. Out of 266 definitely lysogenic strains, 81,9% are at the same time toxigenic.

The severity of clinical forms of diphtheria is determined by the pathogenicity of the diphtheria baccillus involved, due to ecological factors and to the associated microflora, as well as by the factor of deficient mechanisms of natural resistance in the host organism and the absence of immunological response.

LES RAPPORTS ENTRE LA RÉSISTANCE DES STAPHYLOCOQUES AUX ANTIBIOTIQUES ET LEUR SENSIBILITÉ À L'ACTION DES BACTÉRIOPHAGES

par

N. Nestoresco, Marcela Popovici et Ecaterina Alexenco

(Travail du laboratoire de la Chaire de Microbiologie II et de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino »)

— Manuscrit reçu le 4 juillet 1959 —

La capacité des staphylocoques de produire des variantes résistantes paraît être accrue; l'incidence des formes antibiotiques résistantes augmente remarquablement à mesure que l'on emploie, sur une échelle de plus en plus grande, des substances antibiotiques.

Ainsi que les nombreuses observations cliniques le prouvent, la rapidité avec laquelle les germes acquièrent la résistance aux différentes drogues, et la proportion des souches qui deviennent résistantes, présentent de grandes variations. Ce comportement varié des staphylocoques vis-à-vis des antibiotiques dans les hôpitaux, a stimulé l'intérêt des chercheurs de laboratoire qui voulaient élucider le mécanisme de production de la résistance, par rapport aux caractères particuliers des souches et par rapport au potentiel des différentes drogues d'induire la résistance.

Le problème des relations entre l'acquisition de la résistance des staphylocoques vis-à-vis des substances antibiotiques et les caractères métaboliques de pathogénité, ainsi que leur sensibilité aux phages spécifiques, malgré les nombreuses recherches effectuées ces derniers dix ans, se trouve encore très controversé.

Ainsi, si nous nous en référions seulement aux observations concernant les rapports entre l'appartenance des staphylocoques à certains types de phages et leur aptitude d'acquérir la résistance, une série de chercheurs (Barber et coll. en 1948 et 1949; Rountree en 1949 et 1953, Vogelsang en 1953 et 1956; Jackson, Knight et Holzer, Wallmark en 1954, etc.) ont prouvé la prédominance des variantes pénicillino-résistantes et des variantes résistantes à plusieurs antibiotiques, parmi les staphylocoques appartenant au groupe phagique III. Barber et Whitehead suggéraient en 1949 que les souches du groupe III seraient, du point de vue génétique, moins stables que celles des autres groupes et donc particulièrement aptes à devenir résistantes aux antibiotiques.

Williams et coll. (1953) attiraient l'attention sur les souches pénicillino-résistantes, appartenant au groupe phagique II. Barber et Burston, en 1955, montraient la fréquence des variantes pénicillino-résistantes parmi les lysotypes du groupe I; Schmidt et Lenk (1958), ne trouvent pas les staphylocoques du groupe III plus résistants aux antibiotiques que ceux du groupe I, et démontrent que parmi les divers lysotypes il existe différents degrés de sensibilité ou de résistance aux antibiotiques.

En Roumanie, Ciucă, Nestoresco, Popovici et coll., Nestoresco et coll. (1957), ont trouvé que les souches de type 80 sont résistantes à la pénicilline dans 98% des cas.

Un autre point controversé du problème est celui des éventuelles modifications des caractères biologiques qui accompagnent la résistance acquise des staphylocoques aux antibiotiques.

De nombreuses recherches sur les caractéristiques des variantes pénicillino-résistantes obtenues expérimentalement, ont mis en évidence des modifications de morphologie, de pathogénité, d'activité métabolique, etc.

Ainsi, North et Christie (1946) ont démontré que parmi les variantes pénicillino-résistantes il y a une réduction de la pigmentogénèse, un ralentissement de la croissance, un abaissement de la virulence et M. Ciucă, Lydia Mesrobeano et coll. ont décrit — sous l'influence de la pénicilline, — des variantes résistantes avec modifications morphologiques des colonies, modifications de la pigmentogénèse, de l'activité hémolytique, fermentative et de la capacité de produire la coagulase.

Moroz a obtenu des variantes de staphylocoques résistantes à la grisémine qui coagulent le plasma avec retard; elles ont une virulence diminuée et une capacité hémolytique et fermentative réduite. Par ailleurs, Richou, Kourilsky et coll. (1956) ont noté une transformation des propriétés toxigéno-gélatinolytiques chez les staphylocoques devenus résistants « in vitro » à la pénicilline et streptomycine.

Des modifications dans la morphologie des colonies consistant en petites colonies «G» ont été décrites par Schnitzer et coll. (1943), Youmans et coll. (1945), Eriksen k. (1946), Wise (1956), etc.; on a également décrit des modifications dans la forme et la colorabilité des staphylocoques résistants (Smith et Hay — 1942; Bellamy et Klimek — 1948 — ; Blair et coll. — 1946—; Barber — 1953).

En ce qui concerne la sensibilité au bactériophage des staphylocoques avec une résistance acquise expérimentalement, on a obtenu, de même, des résultats variés, en fonction de l'antibiotique et des souches de staphylocoques employés. Un grand nombre de recherches ont mis en évidence une coïncidence entre l'acquisition de la résistance aux antibiotiques et la phagorésistance (M. Ciucă et coll. — 1950; B. Wallmark — 1954; Matejovska et Jelinek— 1957, etc.). Dans d'autres travaux, on a décrit des modifications qualitatives de lysosensibilité. Voir les expériences de Gould (1955), qui a obtenu en même temps que l'induction de la résistance aux antibiotiques — des transformations de lysotype des groupes I et II en groupe III.

Une série d'autres auteurs, parmi lesquels Demerec, Blair et coll., Barbour et Edwards, Barber, Fouace, Fusilio, etc., soutiennent, au contraire, la persistance de la lysosensibilité des variantes devenues résistantes aux antibiotiques.

Dans le présent travail, nous nous sommes proposés de déterminer la capacité des antibiotiques couramment employés, d'induire «in vitro» la résistance aux staphylocoques pathogènes appartenant à différents types phagiques, ainsi que d'étudier quelques-uns des caractères biologiques, inclusivement la sensibilité aux phages spécifiques des variantes résistantes obtenues.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons etudié un nombre de 19 souches de staphylocoques pathogènes, dont 18 dorés et une souche de staphylocoque blanc. Les staphylocoques étudiés étaient de provenance variée; furoncles, toxi-infections alimentaires, porteurs

ains et souches de collection. Par rapport aux tests classiques de pathogénité « in vitro » (élaboration de coagulase et fibrinolysine, activité hémolytique, fermentation de la manite) toutes les souches ont été considérées comme des staphylocoques pathogènes; elles étaient sensibles aux bactériophages antistaphylococciques constituant le set de base.

Les substances antibiotiques employées dans l'expérience ont été: la pénicilline, la streptomycine, l'auréomycine, le chloramphénicole et l'érythromycine.

On a déterminé, initialement, pour toutes les souches, la limite de la sensibilité vis-à-vis des antibiotiques sus-mentionnés, sur des milieux de culture liquides et solides.

Nous avons procédé ensuite à l'adaptation en cultivant des staphylocoques en contact avec des quantités progressives d'antibiotiques, en utilisant deux méthodes différentes:

1) Cultures répétées dans du bouillon contenant des quantités progressives d'antibiotiques, en partant de la tolérance initiale; comme inoculum, nous nous sommes servis d'une quantité fixe de germes (environ 1000 staphylocoques/ml) (cultures de 24 heures en bouillon), incubation de trois jours à 37°, suivi d'un repiquage sur gélose simple.

2) Cultures des souches en cours d'adaptation, sur gélose en plaque, au milieu de laquelle, une demi-heure après l'ensemencement de la souche à étudier, on déposait à l'aide d'une pipette 0,05 ml la dilution d'antibiotique (contenant des quantités progressives d'antibiotiques). Après trois jours d'incubation à 37°, on repiquait les colonies marginales de l'aire d'inhibition sur gélose simple, répétant ensuite l'incubation en présence de l'antibiotique respectif (méthode décrite par Lydia Mesrobeano et coll. 1949).

On a effectué en tout 11 passages en milieu liquide et 25 sur milieu solide, en présence de quantités progressives des cinq substances antibiotiques énumérées plus haut. Dans le but d'interprêter le mécanisme de la résistance induite aux souches étudiées par la pénicilline, on a recherché la production de la pénicillinase des souches d'origine, de même que des variantes résistantes.

On a employé la méthode suivante;

La culture en bouillon, âgée de 24 heures, — du staphylocoque à étudier - était ajoutée à un volume égal d'une dilution adéquate de pénicilline. Après une heure d'incubation à 37°, on déposait une quantité de 0,05 du mélange sur une rondelle de papier filtre avec un diamètre de 1,5 cm au milieu d'une plaque de gélose, préalablement ensemencée avec culture de staphylocoque Oxford. Après 24 heures d'incubation à 37,° on faisait la lecture des résultats en calculant la production de pénicillinase par rapport à la quantité de drogue, contenue dans 0,05 ml du mélange inactivé. Nous avons étudié les caractères de pathogénité par les tests classiques «in vitro» — pigmentogénèse, production de coagulase et de fibrinolysine, activité hémolytique, fermentation de la manite—et la lysosensibilité (vis-à-vis de 21 préparations de phages du set de base), des variantes résistantes obtenues, parallèlement aux souches d'origine.

Afin de pouvoir apprécier la stabilité du degré de résistance acquise, sept des quatre variantes obtenues — dont quatre vis-à-vis de l'érythromycine (st. 80, st. 2 al, st. 16 b. et st 11 al) et trois vis-à-vis de la streptomycine (st. 16 b, st. 3425 et st. 3424) ont été repiquées journellement sur plaques de gélose en l'absence de la drogue, retestant ensuite la résistance à l'antibiotique respectif, la lysosensibilité et les caractères de pathogénité « in vitro ».

Résistance induite des staphylocoques à la pénicilline; caractères de

Souche microbienne	Provenance	Caractères de pathogénité de la souche d'origine «in vitro»				Lysosensibilité de la souche d'origine	Groupe phagique
		pig.	coag.	hém.	manite		
Staph. 29	collection	doré	+	+	+	29/CL	I
Staph. 3 A	collection	doré	+	+	+	3A/CL	II
Staph. 70	collection	doré	+	+	+	70/SCL	III
Staph. Ana	furoncle	doré	+	+	+	29/+++ 80+++	I
Staph. 2 al	tox. inf. alim.	doré	+	+	+	3A/+++3B/++ 3C/++	II
Staph. 11 al	tox. inf. alim.	blanc	+	+	+	3A/+++3B/++ 3C++	II
Staph. 3424	porteur	doré	+	+	+	7/CL47/CL 53/++75/CL 77/CL	III
Staph. 3425	porteur	doré	+	+	+	7/CL47/CL 53/++75/CL 77/CL	III
Staph. Oxford	(collection)	doré	+	+	+	42D/CL	IV
Staph. Agn. P	furoncle	doré	+	+	+	80/CL	I
Staph. 731	tox. inf. alim.	doré	+	+	+	29/SCL	I

Résistance induite des staphylocoques à la stréptomycine; caractères

Souche microbienne	Provenance	Caractères de pathogénité de la souche d'origine «in vitro»				Lysosensibilité de la souche d'origine	Groupe phagique
		pig.	coag.	hém.	manite		
Staph. 29	collection	doré	+	+	+	29/CL	I
Staph. 3A	collection	doré	+	+	+	3A/CL	II
Staph. 70	collection	doré	+	+	+	70/SCL	III
Staph. 42 D	collection	doré	+	+	+	42 D/CL	IV
Staph. 80	collection	doré	+	+	+	80/CL	I
Staph. Ana	furoncle	doré	+	+	+	29/+++ 80/+++	I
Staph. 2 al	tox. inf. alim.	doré	+	+	+	3A/+++ 3B/++ 3C/++	II
Staph. 11 al	tox. inf. alim.	blanc	+	+	+	3A/+++ 3B/++ 3C/++	II
Staph. 3424	porteur	doré	+	+	+	7/CL 47/CL 53/ CL 75/CL 77/CL	III
Staph. 3425	porteur	doré	+	+	+	7/CL 47/CL 53/ ++75/CL 77/CL	III
Staph. 16 b	porteur	doré	+	+	+	75/SCL	III
Staph. Oxford	collection	doré	+	+	+	42D/CL	IV
Staph. 731	tox. inf. alim.	doré	+	+	+	29/SCL	I

Tableau I

pathogénité et lysosensibilité des souches d'origine et des variantes

Tolérance limite de la souche d'origine vis-à-vis de l'antibiotique	Tolérance de la variante obtenue à l'antibiotique	Devenu... fois plus résistant	Lysosensibilité de la variante obtenue	Caractères de pathogénité de la var. obtenue			
				pig.	coag.	hém.	manite
0,03 unit.	0,1 unit.	3,3 fois	29/CL	doré	+	+	+
0,025 unit.	1 unit.	40 fois	3A/CL	doré	+	+	+
0,05 unit.	0,2 unit.	4 fois	70/SCL	doré	+	+	+
0,025 unit.	0,1 unit.	4 fois	29/+++ 80/+++	doré	+	+	+
0,01 unit.	0,2 unit.	20 fois	3A/+++3B/++ 3C/++	doré	+	+	+
0,01 unit.	0,5 unit.	50 fois	3A/+++3B/++ 3C/++	blanc	+	+	+
0,025 unit.	0,2 unit.	8 fois	7/CL47/CL 53/++75/CL 77/CL	doré	+	+	+
0,05 unit.	0,5 unit.	10 fois	7/CL47/CL 53/++75/CL 77/CL	doré	+	+	+
0,02 unit.	0,2 unit.	10 fois	42D/CL	doré	+	+	+
0,025 unit	1 unit.	40 fois	80/CL	doré	+	+	+
0,025 unit.	0,2 unit.	10 fois	29/SCL	doré	+	+	+

Tableau II

de pathogénité et lysosensibilité des souches d'origine et des variantes

Tolérance limite de la souche d'origine vis-à-vis de l'antibiotique	Tolérance de la variante obtenue à l'antibiotique	Devenu... fois plus résistant	Lysosensibilité de la variante obtenue	Caract. de la pathogénité de la variante obtenue			
				pig.	coag.	hém.	manite
0,5 gamma	1.000 gamma	2.000 fois	29/CL	doré	+	+	+
1,5 »	150.000 »	100.000 fois	3A/CL	doré	+	+	+
2 »	200.000 »	100.000 fois	70/SCL	doré	+	+	+
1,5 »	150.000 »	100.000 fois	42D/CL	doré	+	+	+
4 »	200.000 »	50.000 fois	80/CL	doré	+	+	+
4 »	100.000 »	50.000 fois	29/+++ 80/+++	doré	+	+	+
3 »	150.000 »	50.000 fois	3A/+++ 3B/++ 3C/++	doré	+	+	+
3 »	1.500 »	500 fois	3A/+++ 3B/++ 3C/++	blanc	+	+	+
4 »	200.000 »	50.000 fois	7/CL 47/CL 53/ ++75/CL 77/CL	doré	+	+	+
4 »	200.000 »	50.000 fois	7/CL 47/CL 53/ ++75/CL 77/CL	doré	+	+	+
8 »	200.000 »	25.000 fois	75/SCL	doré	+	+	+
4 »	200.000 »	50.000 fois	42D/CL	doré	+	+	+
4 »	200.000 »	50.000 fois	29/SCL	doré	+	+	+

Résistance induite des staphylocoques au chloramphénicole; caractères

Souche microbienne	Provenance	Caractères de pathogénité de la souche d'origine « in vitro »				Lysosensibilité de la souche d'origine	Groupe phagique
		pig.	coag.	hém.	manite		
Staph. 29	collection	doré	+	+	+	29/CL	I
Staph. 3A	collection	doré	+	+	+	3A/CL	II
Staph. 70	collection	doré	+	+	+	70/SCL	III
Staph. 80	collection	doré	+	+	+	80/CL	I
Staph. Ana	furoncle	doré	+	+	+	29/+++	
						80/+++	I
Staph. 2 al	tox. inf. alim.	doré	+	+	+	3A/+++	
						3B/++ 3C/++	II
Staph. 11 al	tox. inf. alim.	blanc	+	+	+	3A/+++	
						3B/++ 3C/++	II
Staph. 3424	porteur	doré	+	+	+	7/CL 47/CL 53/	
						++ 75/CL 77/Cl	III
Staph. 3425	porteur	doré	+	+	+	7/CL 47/CL 53/	
						++75/CL 77/CL	III
Staph. 16 b	porteur	doré	+	+	+	75/SCL	III
Staph.Oxford	collection	doré	+	+	+	42/D/CL	IV
Staph.Agn.P	furoncle	doré	+	+	+	80/CL	I
Staph. 731	tox. inf. alim.	doré	+	+	+	29/SCL	I

Résistance induite des staphylocoques à l'auréomycine; caractères

Souche microbienne	Provenance	Caractères de pathogénité de la souche d'origine « in vitro »				Lysosensibilité de la souche d'origine	Groupe phagique
		pig.	coag.	hém.	manite		
Staph. 29	collection	doré	+	+	+	29/CL	I
Staph. 3A	collection	doré	+	+	+	3A/CL	II
Staph. 70	collection	doré	+	+	+	70/SCL	III
Staph. 42 D	collection	doré	+	+	+	42D/CL	IV
Staph. 80	collection	doré	+	+	+	80/CL	I
Staph. Ana	furoncle	doré	+	+	+	29/+++	
						80/+++	I
Staph. 2 al	tox. inf. alim.	doré	+	+	+	3A/+++	
						3B/++ 3C/++	II
Staph. 11 al	tox. inf. alim.	blanc	+	+	+	3A/+++	
						3B/++ 3C/++	II
Staph. 3424	porteur	doré	+	+	+	7/CL 47/CL 53/	
						++75/CL 77/CL	III
Staph. 3425	porteur	doré	+	+	+	7/CL 47/CL 53/	
						++75/CL 77/CL	III
Staph. 16 b	porteur	doré	+	+	+	75/SCL	III
Staph.Oxford	collection	doré	+	+	+	42D/CL	IV
Staph.Agn.P.	furoncle	doré	+	+	+	80/CL	I
Staph. 731	tox. inf. alim.	doré	+	+	+	29/SCL	I

Tableau III

e pathogénité et lysosensibilité des souches d'origine et des variantes

olérance limite de souche d'origine vis-à-vis de l'antibiotique	Tolérance de la variante obtenue à l'antibiotique	Devenu . . . fois plus résistant	Lysosensibilité de la variante obtenue	Caract. de la pathogénité de la variante obtenue			
				pig.	coag.	hém.	manite
1,5 gamma	20 gamma	13,33 fois	29/CL	doré	+	+	+
2,5 »	100 »	40 fois	3A/CL	doré	+	+	+
2,5 »	200 »	80 fois	70/SCL	doré	+	+	+
2 »	30 »	15 fois	80/CL	doré	+	+	+
2,5 »	20 »	8 fois	29/+++ 80/+++	doré	+	+	+
2,5 »	50 »	20 fois	3A/+++ 3B/++ 3C/++	doré	+	+	+
2,5 »	50 »	20 fois	3A/+++ 3B/++ 3C/++	blanc	+	+	+
2,5 »	50 »	20 fois	7/CL 47/CL 53/ ++75/CL 77/CL	doré	+	+	+
2,5 »	50 »	20 fois	7/CL 47/CL 53/ ++75/CL 77/CL	doré	+	+	+
2,5 »	200 »	80 fois	75/SCL	doré	+	+	+
2,5 »	20 »	8 fois	42D/CL	doré	+	+	+
2,5 »	100 »	40 fois	80/CL	doré	+	+	+
2,5 »	20 »	8 fois	29/SCL	doré	+	+	+

Tableau IV

le pathogénité et lysosensibilité des souches d'origine et des variantes

l'olérance limite de a souche d'origine vis-à-vis de l'antibiotique	Tolérance de la variante obtenue à l'antibiotique	Devenu . . . fois plus résistant	Lysosensibilité de la variante obtenue	Caract. de la pathogénité de la variante obtenue			
				pig.	coag.	hém.	manite
0,2 gamma	0,5 gamma	2 fois	29/CL	doré	+	+	+
0,2 »	0,5 »	2 fois	3A/CL	doré	+	+	+
0,2 »	0,5 »	2 fois	70/SCL	doré	+	+	+
0,2 »	0,5 »	2 fois	42D/CL	doré	+	+	+
0,2 »	0,5 »	2 fois	80/CL	doré	+	+	+
0,2 »	0,5 »	2 fois	29/+++ 80/+++	doré	+	+	+
0,2 »	0,5 »	2 fois	3A/+++ 3B/++ 3C/++	doré	+	+	+
0,2 »	0,5 »	2 fois	3A/+++ 3B/++ 3C/++	blanc	+	+	+
0,2 »	0,5 »	2 fois	7/CL 47/CL 53/ ++75/CL 77/CL	doré doré	+ +	+ +	+ +
0,2 »	0,5 »	2 fois	7/CL 47/CL 53/ ++75/CL 77/CL	Ldoré	+	+	+
0,2 »	0,5 »	2 fois	75/SCL	doré	+	+	+
0,2 »	0,5 »	2 fois	42D/CL	doré	+	+	+
0,2 »	0,5 »	2 fois	80/CL	doré	+	+	+
0,2 »	0,5 »	2 fois	29/SCL	doré	+	+	+

Résistance induite des staphylocoques à l'érythromycine; caractères

Souche microbienne	Provenance	Caractères de pathogénité de la souche d'origine « in vitro »				Lysosensibilité de la souche d'origine	Groupe phagique
		pig.	coag.	hém.	manite		
Staph. 29	collection	doré	+	+	+	29/CL	I
Staph. 3A	collection	doré	+	+	+	3A/CL	II
Staph. 70	collection	doré	+	+	+	70/SCL	III
Staph. 42 D	collection	doré	+	+	+	42D/CL	IV
Staph. 80	collection	doré	+	+	+	80/CL	I
Staph. Ana	furoncle	doré	+	+	+	29/+++	
						80/+++	I
Staph. 2 al	tox. inf. alim.	doré	+	+	+	3A/+++	II
						3B/++ 3C/++	II
Staph. 11 al	tox. inf.alim.	blanc	+	+	+	3A/+++	
						3B/++ 3C/++	II
Staph. 3424	porteur	doré	+	+	+	7/CL 47/CL 53/ ++75/CL 77/CL	III
Staph. 3425	porteur	doré	+	+	+	7/CL 47/CL 53/ ++75/CL 77/CL	III
Staph. 16 b	porteur	doré	+	+	+	75/SCL	III
Staph Oxford	collection	doré	+	+	+	42D/CL	IV
Staph. 731	tox. inf. alim.	doré	+	+	+	29/SCL	I

RÉSULTATS

Les tableaux 1, 2, 3, 4 et 5, indiquent le degré de résistance acquise par 14 souches de staphylocoques, après 25 passages sur des milieux contenant des antibiotiques, ainsi que les caractères biologiques des souches d'origine, par rapport à celles des variantes résistantes obtenues.

Des tableaux 1, 2, 3, 4 et 5 on constate en premier lieu, des différences quant à la capacité d'induction de la résistance des antibiotiques employés vis-à-vis du staphylocoque.

Les différences de la capacité d'induire la résistance se sont révélées par le degré de la résistance obtenue et aussi par la durée de la période d'installation de cette résistance.

L'antibiotique qui après 25 passages, a produit le degré le plus élevé de résistance a été la streptomycine; par son action, les souches de staphylocoques sont devenues de 500—100.000 fois plus résistantes.

A la suite d'un nombre égal de passages, l'érythromycine a induit une résistance de 20—40.000 fois supérieure à la résistance de la souche d'origine, le chloramphénicole 8—80 fois, la pénicilline 4—5 fois, alors que l'auréomycine n'a induit à aucune des souches un degré de résistance dépassant le double de la résistance initiale.

Dans nos conditions de travail, les variantes résistantes n'ont présenté aucune modification de la production de coagulase, pigment, action hémolytique et fermentative, activité métabolique. En ce qui concerne la sensibilité vis-à-vis des phages employés, aucune modification d'ordre qualitatif ou de l'intensité lytique n'a été constatée. Nous représentons, dans les figures 1—12, la lysotypie des staphylocoques: 80, Oxford et 3424 chez les souches d'origine sensibles, par rapport aux variantes résistantes.

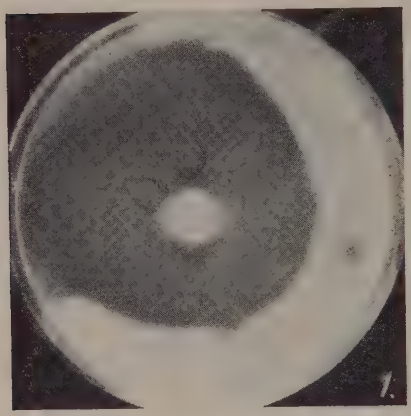
Tableau V

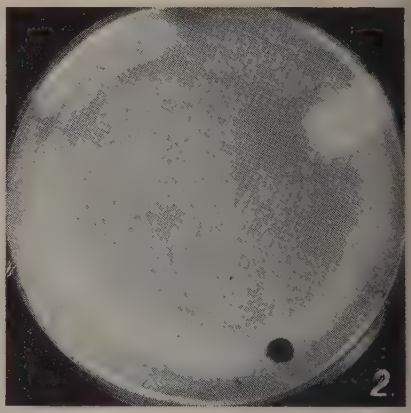
de pathogénité et lysosensibilité des souches d'origine et des variantes

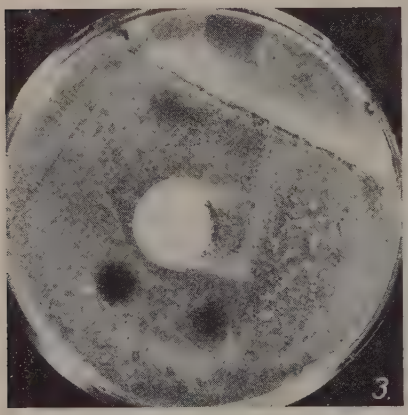
Tolérance limite de la souche d'origine vis-à-vis de l'antibiotique	Tolérance de la variante obtenue à l'antibiotique	Devenu ... fois plus résistant	Lysosensibilité de la variante obtenue	Caract. de la pathog. de la variante obtenue			
				pig.	coag.	hém.	manite
0,1 gamma	2 gamma	20 fois	29/CL	doré	+	+	+
0,1 »	50 »	500 fois	3A/CL	doré	+	+	+
0,25 »	10.000 »	40.000 fois	70/SCL	doré	+	+	+
0,5 »	10.000 »	20.000 fois	42D/CL	doré	+	+	+
0,5 »	10.000 »	20.000 fois	80/CL	doré	+	+	+
0,1 »	20 »	100 fois	29/+++				
			80/+++	doré	+	+	+
0,5 »	10.000 »	20.000 fois	3A/+++				
			3B/++ 3C/++	doré	+	+	+
0,5 »	10.000 »	20.000 fois	3A/+++				
			3B/++ 3C/++	blanc	+	+	+
0,5 »	5 »	50 fois	7/CL 47/CL 53/				
			++75/CL 77/CL	doré	+	+	+
1 »	10.000 »	10.000 fois	7/CL 47/CL 53/				
			++75/CL 77/CL	doré	+	+	+
0,5 »	10.000 »	20.000 fois	75/SCL	doré	+	+	+
0,5 »	10.000 »	20.000 fois	42D/CL	doré	+	+	+
0,5 »	10.000 »	20.000 fois	29/SCL	doré	+	+	+

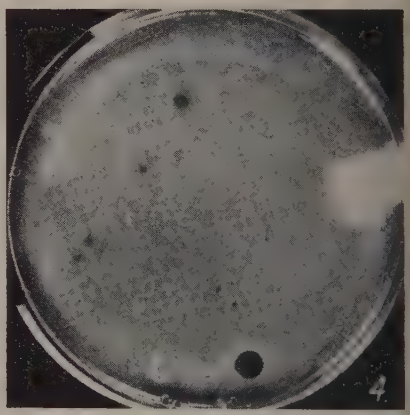
Chez six des souches étudiées, on a remarqué, au cours des passages sur milieux solides avec antibiotiques, l'apparition de colonies résistantes-citrines, (par ex: le staphylocoque «*29*» en présence de l'auréomycine au cours du V, IX et XII-e passage et en présence du chloramphénicole lors du XII-e passage; le staphylocoque «*70*» en présence de l'auréomycine au cours du VIII-e passage et du chloramphénicole au cours du XII-e passage; le staphylocoque «*42 D*» en présence de l'auréomycine au cours des passages VII et X; le staphylocoque «*Oxford*» en présence de la pénicilline au cours des passages VII et XII; le staphylocoque «*3 A*» en présence de l'érythromycine au cours du passage VIII et le staphylocoque «*2 al*» en présence de la streptomycine au passage IX). Les colonies citrines apparaissaient en nombre très réduit (2, 3, 5 colonies par plaque), non seulement à la périphérie de la zone d'inhibition, mais aussi disséminées sur le reste de la plaque 5, 6, 7 jours après l'ensemencement, dont 3 jours d'incubation à 37° et 3—4 jours à la température de la chambre. Les colonies citrines dépourvues de la capacité de produire la coagulase, l'activité hémolytique la fermentation de la manite et, en même temps, résistantes aux bactériophages, présentent donc des caractères ressemblant à ceux décrits par M. Ciucă, L. Mesrobeano et coll. en 1949—1950.

Vis-à-vis d'un même antibiotique on a constaté des différences individuelles quant à leur aptitude d'acquérir la résistance, différences qui ne peuvent être rattachées par l'appartenance à un groupe quelconque de phage; par exemple vis-à-vis de la streptomycine, le staphylocoque 29 est devenu, après 25 passages, 2000 fois plus résistant, tandis que le staphylocoque 80 est devenu 50.000 fois et le staphylocoque doré lysotype 29/80 100.000 fois, quoique toutes ces souches appartiennent au même groupe de phage, le groupe I.









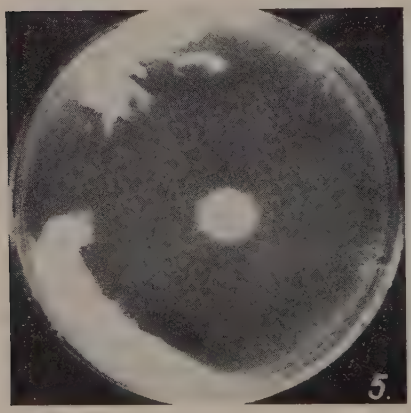


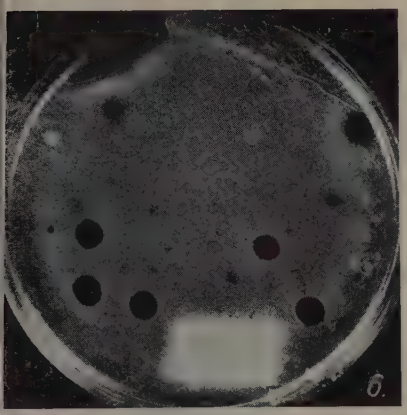
Figure 1. — Staphylocoque de type phagique 80, très sensible à la streptomycine.

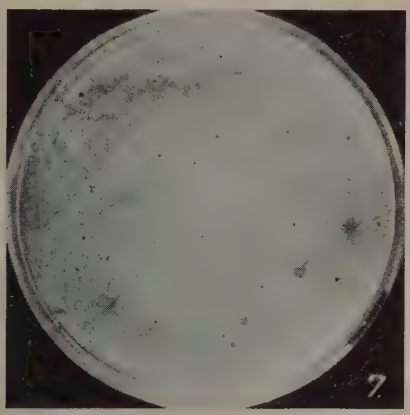
Figure 2. — Staphylocoque de type phagique 80, sensible à la streptomycine; lysé avec lyse confluente (CL) par le phage staphylococcique 80.

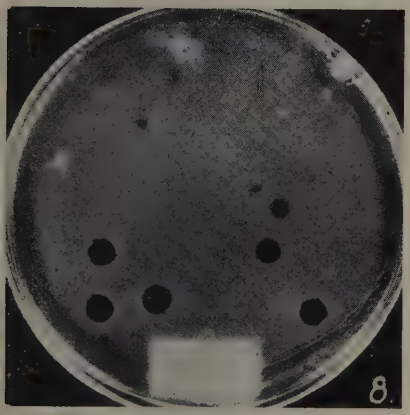
Figure 3. — Staphylocoque de type phagique 80 devenu résistant à la streptomycine.

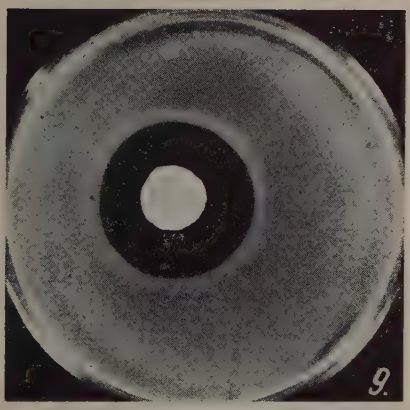
Figure 4. — Staphylocoque de type phagique 80, devenu résistant à la streptomycine; il a gardé la sensibilité envers le phage staphylococcique 80.

Figure 5. — Staphylocoque 3424, très sensible à la streptomycine.









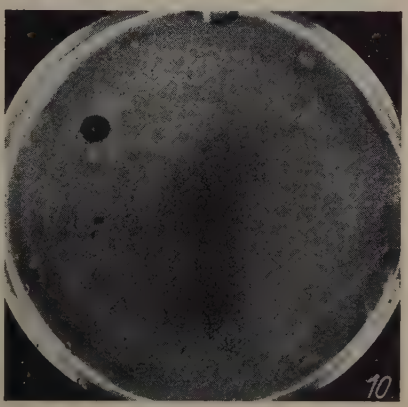


Figure 6. — Staphylocoque 3424, très sensible à la streptomycine, sensible envers les phages staphylococciques type 7/53/54/75/77 (groupe phagique III).

Figure 7. — Staphylocoque 3424, devenu résistant à la streptomycine.

Figure 8. — Staphylocoque 3424, devenu résistant à la streptomycine; il a gardé la sensibilité envers les phages staphylococciques type 7/53/54/75/77.

Figure 9. — Staphylocoque Oxford, sensible à l'action de l'érythromycine.

Figure 10. — Staphylocoque Oxford, sensible à l'action de l'érythromycine et à l'action du phage staphylococcique 42D.

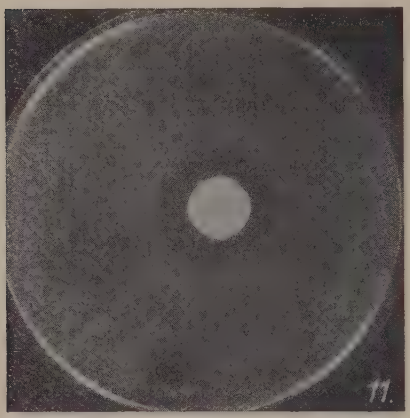


Figure 11. — Staphylocoque Oxford devenu résistant à l'action de l'érythromycine.

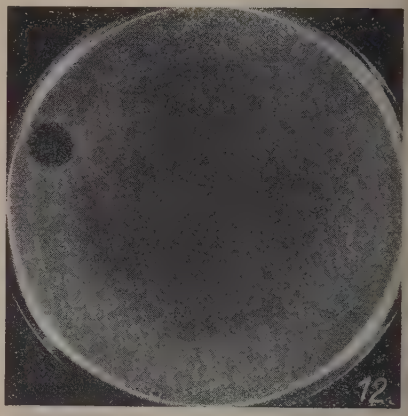


Figure 12. — Staphylocoque Oxford devenu résistant à l'action de l'érythromycine; il a gardé sa sensibilité envers le phage staphylococcique 42D.

Dans le mécanisme de la résistance induite par la pénicilline, il paraît que la production de pénicillinase n'est pas intervenue, restant non-modifiée chez les variantes résistantes.

Dans les milieux liquides, les organismes ont acquis une résistance aux différentes drogues, dans un intervalle de temps plus court que sur des milieux solides. Ainsi, vis-à-vis de la pénicilline, les staphylocoques Oxford et 3425 sont devenus après 25 passages sur milieux solides dix fois plus résistants, alors que sous-cultivés en bouillon + antibiotiques — ont acquis un degré de résistance presque du même ordre, seulement après 7 passages.

Les variantes résistantes obtenues par culture répétée sur bouillon contenant des antibiotiques ont, de même, présenté des caractères de pathogénité et des réactions de sensibilité aux phages, sans modifications par rapport aux souches d'origine.

Les passages répétés (20 fois) sur des milieux dépourvus d'antibiotiques, des quatre variantes résistantes à l'érythromycine et des trois résistantes à la streptomycine, ont mis en évidence la stabilité du degré de résistance acquise pour ces drogues.

Les variantes résistantes, étudiées dans ces conditions, ont également montré des caractères constants de métabolisme et lysosensibilité.

DISCUSSIONS

Ainsi que nous l'avons montré, l'induction de la résistance aux antibiotiques a été obtenue plus facilement dans les milieux liquides que sur des milieux solides. Des observations dans le même genre, ont été faites par MAYR-HARTING (1955), mais il a obtenu des variantes stables pénicillino-résistantes de staphylocoque doré (Oxford), après contact, avec de faibles concentrations de l'antibiotique et seulement, dans un milieu liquide pendant que sur des milieux solides, même après contact prolongé avec l'antibiotique, il n'a pas obtenu de résistance.

En comparant les résultats, obtenus dans nos conditions de travail, en ce qui concerne l'induction de la résistance «in vitro» avec le comportement des antibiotiques en clinique, on remarque une concordance nette dans le cas de la streptomycine, érythromycine et du chloramphénicole.

En ce qui concerne la pénicilline et surtout l'auréomycine — laquelle, comme nous le savons—possède une grande capacité de produire la résistance « in vivo » —, elles manifestent «in vitro» une action inductrice lente et réduite.

Les rapports particuliers écologiques qui s'établissent dans l'organisme entre germe et hôte, créent certainement des conditions différentes de celles « in vitro »— contact germe-antibiotiques — ce qui mène probablement à des modifications du comportement des germes envers ces substances.

En ce qui concerne l'apparition des colonies citrines, — signalées chez six souches de staphylocoques, au cours des passages sur milieux solides en présence des antibiotiques, nous mentionnons le fait qu'elles apparaissaient irrégulièrement, indépendamment du nombre des passages et que leur apparition n'a pas été strictement attachée à l'aire d'inhibition, se trouvant disseminées aussi parmi les colonies situées sur le reste de la plaque de gélose. Dans ces conditions, nous nous demandons si ces colonies ont été déterminées par l'antibiotique ou bien s'il s'agissait plutôt d'une population microbienne, initialement hétérogène, sélectionnée par dissociation. A l'appui de la seconde hypothèse, nous devons mentionner les recherches de NAHOUR se référant à l'hétérogénéité des souches de staphylocoque. Cet auteur, en partant d'une cellule unique, isolée d'une souche de staphylocoque doré, a obtenu dix colonies, dont sept produisant un pigment doré et trois un pigment blanc, présentant en même temps, des variations dans la capacité d'élaborer de la coagulase, dans l'activité hémolytique et la résistance aux antibiotiques.

CONCLUSIONS

1. Nous avons recherché la capacité d'induire «in vitro» la résistance des staphylocoques pathogènes, des antibiotiques (pénicilline, streptomycine, auréomycine, chloramphénicole, érythromycine), couramment employés en clinique.

2. On a étudié comparativement les caractères biologiques — y compris la sensibilité aux phages spécifiques, — chez les souches d'origine antibiotico-sensibles et des variantes résistantes, obtenues par des passages répétés sur milieux solides ou liquides, en présence des doses progressives d'antibiotiques.

3. Nous avons constaté des différences dans la capacité d'induire la résistance des différents antibiotiques, la plus active étant la streptomycine, suivie par l'érythromycine, le chloramphénicole, la pénicilline et l'auréomycine.

4. Les variantes résistantes obtenues, n'ont montré aucune modification de l'activité métabolique.

5. La sensibilité aux bactériophages des variantes résistantes est restée non modifiée.

6. Nous avons constaté des différences individuelles en ce qui concerne l'aptitude des staphylocoques d'acquérir la résistance vis-à-vis de la même drogue.

7. La résistance apparaîssait plus rapidement en milieux liquides que sur milieux solides.

8. La résistance induite s'est montrée stable à la suite de 20 passages sur milieux dépourvus d'antibiotiques.

6 — c. 1627

BIBLIOGRAPHIE

1. Barber M. et Rozwadowska-Dowzenkum. — Lancet 1948, **255,** 641.
2. Barber M. et Whitehead J. E. M. — Brit. Med. J. 1949, **2,** 565.
3. Barber M. et Burston J., — Lancet 1955, **267,** 578.
4. Barbour R. G. H. et Edwards A. — Austr. J. Exp. Biol. Med., Sci, 1953, **31,** 561.
5. Bellamy W. D. et Klimek J. W. — J. Bacteriol. 1948, **55,** 153.
6. Blair J. E., Carr M. et Buchman J. — J. Immunol., 1946, **52,** 281.
7. Ciucă M., Nestoresco N., Popovici M., Alexenco E., Novac S. et Cheptea A. — Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene I. Orig. 1958, **171,** 601.
8. Ciucă M., Mesrobeanu L. et Păunesco E. — Bul. St. Ac. R.P.R., 1950, **2** 849.
9. Eriksen K. — Acta path. microb. Scand. 1946, **23,** 284.
10. Fouace J. — Ann. Inst. Pasteur, 1953, **85,** 390.
11. Fouace J. et Lutz A. — Ann. Inst. Pasteur, 1953, **85,** 387.
12. Fusillo M. H. — Antibiotica 1956, **6,** 125.
13. Glazman M. G. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1953, no. 2,73.
14. Gould J. C. — Nature, 1955, **176,** 176.
15. Jackson G., Lepper M. et Dowling H. — The Journ. of Laboratory and Clinical Med. 1954, **44,** 41.
16. Knight V. et Holzer A. — Journ. of Clin. Investig., 1954, **33,** 1190.
17. Matejovska V. et Jelinek J. — Zentralblatt für Bakteriologie, Parasit. Inf. und Hygiene I Orig., 1958, **171,** 8.
18. Mayr-Harting A. — J. Gen. Microbiol. 1955, **13,** 9.
19. Mesrobeanu L., Mitrica n. et Păunesco E. — Bul. Şt. Ac. R.P.R. 1949, **1,** 205.
20. Moroz A. F. — Jurn. Mikrobiol. Epidemiol. i Immunobiol. 1956, no 1, 29.
21. Nahour M. — C. R. Soc. Biol., 1957, **151,** 674.
22. Nestoresco N. Popovici M., Alexenco E,, Novac S. et Cheptea A. — Communication Congrès Sc. Méd. Section I, Séance 9.V.1957. Bucarest.
23. Nestoresco M., Popovici M. et Alexenco E. — Communication IV Session Scientifique I.M.F., Bucarest, Novembre 1958.
24. Retchmenski S. S. et Szaveljova A. P. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol. 1946, no. 5,55.
25. Richou R., Kourilsky R. et Chirol Cl. — Rev. d'Immunol. 1936, **20,** 360.
26. Rountree P. M. et Thomson E. F. — Lancet 1949, **257,** 501.
27. Rountree P. M. — Lancet 1953, **264,** 514.
28. Schmidt B. et Lenk V. — Zentralblatt für Bakter. Parasit., Inf. und Hygiene I Orig. 1958, **171,** 590.
29. Schnitzer R. J. et Grunberg E. — Drug Resistance of Microorganisms, New-York, Academic Press Inc., 1957.
30. Vogelsang T. M. — Acta Path. Microb. Scand., 1953, **33,** 435.
31. Vogelsang T. M. — Acta Path. Microb. Scand. 1958, **63.** 196.
32. Wallmark G. — Acta Soz. Med. Upsal 1954, **31,** 209.
33. Welsch M. — C. R. Soc. Biol. 1954, **148,** 182.
34. Williams R.E.O. et Rippon J. E. — Lancet 1953, **264,** 510.

ИССЛЕДОВАНИЯ, КАСАЮЩИЕСЯ ОТНОШЕНИЙ МЕЖДУ УСТОЙЧИВОСТЬЮ (ИСКУССТВЕННО ВЫЗВАННОЙ) СТАФИЛОКОККОВ К АНТИБИОТИКАМ И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К СПЕЦИФИЧЕСКИМ ФАГАМ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Вопрос отношений между приобретением устойчивости стафилококками и их чувствительностью к специфическим фагам остается довольно спорным, несмотря на большое число исследований, проведенных в течении последней декады.

В настоящей работе мы поставили себе цель исследовать способность обычно применяемых антибиотиков вызывать устойчивость у патогенных стафилококков, принадлежащих к разным фаговым типам и изучить затем некоторые биологические признаки, среди которых и чувствительность, возникнутых устойчивых вариантов по отношению к специфическим фагам.

Были подвергнуты исследованию 19 штаммов патогенных стафилококков различного происхождения: фурункулы, пищевые токсико- инфекции, здоровые носители и музеиные

штаммы. Проводились повторные пересевы штаммов в присутствии антибиотиков (пенициллин, стрептомицин, хлорамфеникол, эритромицин) в возрастающих количествах, на жидких на твердых питательных средах.

Результаты:

Установлены различия для разных антибиотиков в способности индуцировать устойчивость. Самым активным в этом отношении оказался стрептомицин, затем эритромицин, хлорамфеникол, пенициллин и ауреомицин.

Полученные устойчивые варианты не проявляли изменений обменной деятельности.

Чувствительность устойчивых вариантов к бактериофагам осталась неизмененной.

Установлены индивидуальные различия в способности стафилококков приобретать стойчивость по отношению к одному и тому же антибиотику.

В жидких питательных средах устойчивость возникала скорее чем при помощи пересевов на твердых средах.

Индуцированная устойчивость оказалась стойкой после 20 пересевов на средах без нтибиотиков.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DER « IN VITRO », UNTER DEM EINFLUSS VON ANTIBIOTIKA, BEI STAPHYLOKOKKEN ERZEUGTEN RESISTENZ UND IHRER SENSIBILITÄT GEGENÜBER SPEZIFISCHEN PHAGEN.

ZUSAMMENFASSUNG

Trotz der zahlreichen, im Verlaufe des letzten Jahrzehntes durchgeführten Untersuchungen, ist das Problem der Beziehungen zwischen der von Staphylokokken erworbenen Widerstandsfähigkeit gegen Antibiotika und ihren metabolischen und pathogenen Eigenschaften, owie ihrer Empfindlichkeit gegen spezifische Phagen immer noch teilweise umstritten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fähigkeit der üblichen Antibiotika, bei pathogenen Staphylokokken verschiedener Phagentypen, *in vitro* Resistenz zu erzeugen untersucht und nschliessend einige biologische Eigenschaften der erhaltenen resistenten Varianten, ein-schesslich ihrer Empfindlichkeit gegen spezifische Phagen, einer Untersuchung unterzogen.

Eine Anzahl von 19 pathogenen Staphylokokkenstämmen verschiedener Herkunft Furunkel, Nahrungsmittelvergiftung, gesunde Träger und Stämme aus unserer Sammlung) vurden untersucht. Die Stämme wurden mehrmals, in Anwesenheit von steigenden Quantitäten des Antibiotikums (Penicillin, Streptomycin, Chloramphenikol, Erythromycin), in flüssigen und auf festen Nährböden fortgezüchtet.

Ergebnisse:

Es wurden Unterschiede in der Fähigkeit der verschiedenen Antibiotika Resistenz u erzeugen festgestellt. Am wirksamsten war Streptomycin, gefolgt von Erythromycin, Chloramphenikol, Penicillin und Aureomycin.

Die erhaltenen widerstandsfähigen Varianten wiesen keine Stoffwechselunterschiede auf.

Die Empfindlichkeit der widerstandsfähigen Varianten gegenüber Bakteriophagen blieb nverändert.

Demselben Antibiotikum gegenüber wiesen verschiedene Staphylokokken Unterschiede n der Fähigkeit Resistenz zu erwerben auf.

In flüssigen Nährböden wurde die Widerstandsfähigkeit rascher erworben als auf esten.

Die erzeugte Widerstandsfähigkeit erwies sich nach 20 Überimpfungen auf Nährböden, lie kein Antibiotikum enthielten, als konstant.

INVESTIGATIONS CONCERNING THE RELATIONSHIP BETWEEN THE RESISTANCE OF STAPHYLOCOCCI, AS INDUCED « IN VITRO » BY MEANS OF ANTIBIOTICS, AND THEIR SENSITIVITY TO SPECIFIC PHAGES.

SUMMARY

In spite of the great number of investigations carried out during the past decade, the problem of the relationship between the acquirement of resistance to antibiotics by staphylococci and the metabolic and pathogenic characters as well as the sensitivity to specific phages of the latter is still partly controversial.

In the present work we have attempted to investigate the ability of currently used antibiotics to induce resistance « in vitro » in various pathogenic staphylococci belonging to different phage types, and to determine subsequently some of the biological properties including the sensitivity to specific phages of the resistant variants obtained.

The investigation concerned 19 strains of pathogenic staphylococci of various origin (furuncles, alimentary toxi-infections, healthy carriers, and strains from our collection). The strains were repeatedly subcultured in fluid and on solid media, in the presence of increasing amounts of antibiotics (penicillin, streptomycin, chloramphenicol, erythromycin).

Results:

Differences as regards the ability of various antibiotics to induce resistance were found to exist, the most active being streptomycin followed by erythromycin, chloramphenicol, penicillin, and aureomycin.

The variants obtained did not display any differences as regards metabolic activity.

The sensitivity of resistant variants to bacteriophages remained unchanged.

Individual differences were found to exist as regards the ability of staphylococci to acquire resistance versus the same drug.

Resistance was more rapidly acquired in fluid media than by subcultures on solid media.

The induced resistance was found to be constantly maintained after 20 subcultures in media without antibiotics.

LYSOTYPIE DES *SHIGELLA*

OTE I. SCHÉMA PROVISOIRE DE LYSOTYPIE DE *SH. FLEXNERI TYPE 2a* À L'AIDE DES SPÉCIMENS DE PHAGES ENDOGÈNES PROVENANT DES SOUCHES PARACOLI AÉROGÈNES ET ANAÉROGÈNES, ADAPTÉS À DIFFÉRENTES SOUCHES D'ENTÉROBACTERIACÉES

par

G. ISTRATI

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de la Dysenterie)

— Manuscrit reçu le 10 juin 1959 —

La méthode de la lysotypie prend une importance de plus en plus grande u point de vue épidémiologique, vu qu'il est impossible de mettre en évidence, ar les méthodes sérologiques les différences existant entre les souches actériennes appartenant à un même type sérologique.

Les résultats obtenus par SARTORIUS et REPLOH (1932(1)), qui ont essayé de ifférencier la *Sh. flexneri*, en utilisant la sensibilité de ces germes envers certains hages, n'ont pas été satisfaisants. En revanche, de nombreux auteurs ont réussi réaliser (pour d'autres germes) des méthodes de lysotypie ayant une valeur ratique exceptionnelle, du point de vue épidémiologique, sur plan local, régional mondial (EVANS (2) pour les streptocoques, CRAIGIE et YEN (3,4) pour la S. phy Vi, FELIX et CALLOW (5,6) pour la *S. paratyphy* B, LILLEENGEN (7) et par la ite FELIX (8) pour la *S. typhi murium*, FISK (9), ainsi que WILSON et ATKIN-ON (10) pour les staphylocoques.

En Roumanie, (M. CIUCA, C. COMBIESCO, N. NESTORESCO, C. ZILIȘTEANU, I. POPOVICI, M. NICOLESCO, N. MANOLIU, A. BRAILOIU, Gh. BUSTEA et V. TEFANESCO (11, 12, 13, 14, 15, 16), ont apporté une contribution de valeur au roblème de la lysotypie des b. typhiques, typhi murium et staphylocoques.

En ce qui concerne les *Shigella*, signalons les travaux de HAMMARSTRÖM 7, 18), qui ont mis les bases de la lysotypie de la *Sh. sonnei* «*R*», à l'aide de 11 hages, déterminant 68 lysotypes. La méthode a été vérifiée par 121 épidémies niformes. RAŠKA, MALIŠOVA et MOSACEK (19), en Tchécoslovaquie, ont établi ue de 168 souches de *Sh. sonnei* «*R*» 30% appartenaient au type 3. MAYR et ARTING (Angleterre (20)) trouvent de même, que parmi 560 souches de *nnei* «*R*», 81% étaient du type 3; LUDFORD (21) a établi que sur 244 souches *Sh. sonnei* «*R*», isolées en Australie et Tasmanie, 85% appartenaient au type). Ces deux derniers résultats amoindrissent la valeur de la méthode, vu la prépondominance d'un lysotype unique.

SCHECHTER et coll. (22), ont isolé une série de bactériophages des eaux 'égout, les entraînant sur différents types de b. dysentériques du groupe B, ans le but de déterminer les souches appartenant à ce groupe. Ils considèrent u'il existerait un parallélisme entre la lysotypie et le type sérologique. GASPAR Y (23) obtient des résultats similaires en 1958, utilisant 13 bactériophages iso-s des excréments de poule.

Récemment, Mieczyslaw-metzger et coll. (24) ont publié leurs recherches, effectuées sur une série de 11 phages, pour la lysotypie des premiers 4 types sérologiques de b. dysentériques du groupe B. A cette fin, ils ont préparé des bactériophages à partir des excréments de poule et des fèces d'homme, les entraînant sur certaines souches de b. dysentériques appartenant à différents types sérologiques. Pour les types sérologiques 1a, 1b et 2a, ils distinguent 5 lysotypes et pour les types 2b, 3 et 4a, respectivement 2, 3 ou 4 lysotypes pour chaque type. A l'exception du type 1a, dont les lysotypes A, A_1 et B, représentent 33,9, 22,9 et 35,9% des souches microbiennes testées, chez tous les autres types sérologiques prédomine un seul lysotype, comprenant 86,7, 91,4 et 98,9% des souches testées.

De même que dans le cas de la lysotypie de *Sh. sonnei* «*R*» à l'aide des bactériophages de Hammerström, la méthode employée avec ces phages, pour la *Sh. flexneri* (groupe B) est inappliquable du point de vue pratique étant donné l'existence d'un lysotype dominant.

Recherches personnelles. Le but principal de nos recherches a été de réaliser la lysotypie des b. dysentériques du groupe B et spécialement celle du type 2a, prédominant en Roumanie. Pendant un certain temps, nous avons essayé d'obtenir les bactériophages des eaux d'égout, ainsi que des bactériophages endogènes, provenant de différentes souches lysogènes de *Sh. flexneri 2a*, adaptées sur différentes souches de *B. dysentériques* du même type. De cette manière, on a réussi à obtenir des bactériophages à partir de la majorité des souches testées, notre choix se limitant à 11 de ces bactériophages. A l'aide de ces phages on a testé 76 souches de *Sh. flexneri type 2a*, isolées des cas sporadiques. On a mis en évidence 16 lysotypes, dont 15 ne comprenaient que 1,3—2,6% des souches testées, le reste de 73,6% appartenant à un seul lysotype. Vu que la lysotypie avec les phages utilisés est également inappliquable du point de vue pratique, on a cessé les expériences avec les bactériophages des eaux d'égout ou des phages endogènes, obtenus des souches lysogènes de *Sh. flexneri type 2a*.

Ces résultats sommairement exposés, nous ont déterminé à essayer d'obtenir des bactériophages endogènes à partir des souches de *B. para-coli* et, éventuellement, des colibacilles. En partant de 4 spécimens phagiques, adaptés sur différentes souches de: *Sh. flexneri type 2a* «*S*» ou «*R*», *Sh. boydi*, *B. para-coli*, etc., on a réalisé un set de phages, utilisés, en premier lieu, pour la lysotypie des souches de *Sh. flexneri 2a.*

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. 12 souches de *B. para-coli*, isolées des matières fécales.
2. 63 souches de *Sh. flexneri type 2a* (groupe B) isolées des cas sporadiques de maladie.
3. 11 souches de *B. Shiga-Kruse.*
4. 5 souches de *B. coli.*
5. 7 souches de *Sh. boydi.*
6. Bouillon simple avec peptone Witte, pH=7,8.
7. Gélose nutritive 2%, pH=7,8 (peptone Witte)
8. Chloroforme p.a. Merck.

Isolement des bactériophages endogènes. Les souches de *B. para-coli*, ensemencées en bouillon, incubées 20 heures à 37°, ont été inactivées par chloroforme (5—10%) pendant 1—2 heures, à la température du laboratoire, conservées ensuite 24 heures à+4° et finalement centrifugées à 7000 t/m. Les surnageants

nt été testés, sur boîtes Petri avec gélose, pour différentes souches de *Sh. flexeri 2a*, *Sh. boydi*, *Shiga-Kruse*, *Para-coli et Coli «Brx»*.

Les plages phagiques étaient recoltées avec la spatule (loupe binoculaire), insi qu'une quantité infime de culture et passées en 2 ml bouillon; ou bien la ulture sur boîte était tuée au chloroforme et les plages récoltées et passées sur ouillon, en ajoutant une goutte de culture sensible de 3 heures.

Après incubation de 3 heures à 37° (en agitant continuellement les tubes) a culture a été inactivée au chloroforme et après 30 minutes de repos à la tem-érature de la chambre, conservée jusqu'au lendemain à +4°. Après 5-7-10 ntraînements à l'aide d'une ou deux gouttes de culture de 3 heures de la souche ysosensible, on a effectué d'autres entraînements, à partir d'une seule plage, fin d'obtenir une culture pure de bactériophages. Au moment où on a consi-téré le nombre d'entraînements suffisant, la souche qui avait servi à l'entraî-nement a été ensemencée sur boîte Pétri (culture de 3 heures), en ajoutant 10—12 gouttes du phage respectif. Après incubation de 20 heures à 37°, les zones de yse, ainsi qu'une infime quantité de culture, ont été récoltées à l'aide d'une petite patule et introduites dans un récipient contenant 80 ml bouillon. Après 3 heures à 37°, on a ajouté du chloroforme et conservé le produit à +4° jusqu'au lende-nain. Les bactériophages, préparés de cette manière, ont été titrés vis-à-vis les souches lysosensibles utilisées (boîtes avec gélose 2%).

RÉSULTATS

Des 12 souches de *B. para-coli* étudiées, les souches: anaérogène 788 et nérogène 2784, ont libéré des phages qui ont faiblement lysé quelques souches de *Sh. flexneri 2a* et *B. Shiga-Kruse* (5-20 plages); les phages provenant des souches nérogènes 964 et 2794 ont lysé seulement une souche de *Sh. flexneri*, une de *Coli «Brx»* ou une de *Para-coli 92*. L'entraînement de ces bactériophages a été effectué selon la méthode indiquée, en testant après 2—8 entraînements, leurs qualités lytiques; le titre de certains bactériophages n'a pas augmenté de manière satisfaisante; d'autres à titre suffisant, présentaient un spectre de lyse variant d'un phage à l'autre. Seuls les phages ayant tendance à augmenter leur titre ont été entraînés et adaptés sur différentes souches de *Sh. flexneri 2a* «S» et «*R*», sur *Sh. boydi*, *Coli «Brx»*, *Para-coli 92 et 1236*.

Utilisant les bactériophages endogènes, obtenus des souches lysogènes de *B. Para-coli* 788, 964, 2784 et 2794, entraînés et adaptés sur les souches mention-nées, on a préparé 15 variantes phagiques, comme suit: du spécimen de phage endogène 788—7 variantes; du spécimen 946 — une seule variante; du spécimen 2784 — 4 variantes et du spécimen 2794 — 3 variantes (Tableau I). La capacité lytique des 15 variantes préparées, par rapport aux 16 souches de *Sh. flexneri type 2a* est montrée dans le tableau II.

Il ressort du tableau II que la majorité des variantes phagiques ne lysent qu'un nombre relativement restreint, mais différent de souches de *Sh. flexneri 2a*. Si une variante phagique est adaptée à une autre souche inductrice, le phage acquiert des propriétés lytiques nouvelles: celles de diminuer ou d'agrandir le spectre de lyse ou de lyser de toutes autres souches que celles qu'il lysait au début. Ceci dénote la grande capacité d'adaptation aux souches inductrices des spécimens phagiques obtenus à partir des *B. Para-coli* lysogènes. On constate également qu'on peut obtenir des variantes phagiques différentes, en fonction des qualités variées des souches inductrices.

Tableau I

Procédé de préparation de 15 variantes phagiques par adaptation des 14 spécimens phagiques endogènes à différentes espèces bactériennes

Spécimens phagiques endogènes qui ont servi à la préparation de différentes variantes	Souches utilisées à l'adaptation des spécimens phagiques endogènes	Nombre des entraînements	Titre de la variante phagique	Lyse confluente CL	Lyse confluente avec cultures fines résistantes à la dilution (CL)	Variante phagique obtenue
788 (du Para-coli No. 788)	Sh. flexneri 11 « R » 2a. .	15	10^{-8}	10^{-3}	—	H (1)
	Sh. flexneri 11 « R » type 2a Coli Brx. « R »	2 13	10^{-8}	10^{-3}	—	(2)
	Sh. flexneri 11 « R » type 2a Coli Brx. « R » . . . . . Para-coli 92.	2 1 12	10^{-5}	non-dilué	10^{-1}	M (3)
	Sh. flexneri 11 « R » type 2a Para-coli 1236.	9 12	10^{-7}	10^{-2}	—	L (4)
	Sh. flexneri 11 « R » type 2a Para-coli 1236. . . . . . Sh. flexneri 10 « R » 2a .	9 9 3	10^{-6}	10^{-1}	—	E (5)
	Sh. flexneri 11 « R » type 2a Coli Brx. « R » . . . . . Sh. flexneri 20716 « S » 2a	2 13 14	10^{-6}	10^{-1}	—	F (6)
	Sh. flexneri 11 « R » type 2a Coli Brx . . . . . . Sh. flexneri 21716 « S » 2a Sh. flexneri 10 « R » type 2a	2 13 3 15	10^{-7}	10^{-2}	—	J (7)
946 (du Para-coli No. 946)	Sh. flexneri 11 « R ». . .	10	10^{-6}	—	10^{-1}	G (8)
	Sh. flexneri 4 « S » type 2a	14	10^{-8}	10^{-3}	—	C (9)
	Sh. flexneri 11 « R ». . . Para-coli 92	1 13	10^{-6}	10^{-1}	10^{-2}	A (10)
2784 (du Para-coli No. 2784)	Sh. flexneri 11 « R ». . . Para-coli 92 . . . . . . Sh. boydi 5	1 4 6	10^{-7}	10^{-2}	—	B (11)
	Sh. flexneri 11 « R ». . . Para-coli 92 . . . . . . Sh. boydi 7	1 4 6	10^{-7}	10^{-2}	—	B1 (12)
2794 (du Para-coli No. 2794)	Sh. flexneri 11 « R ». . .	15	10^{-8}	10^{-3}	—	I (13)
	Sh. flexneri 11 « R ». . . Sh. flexn. 20557 «S» type 2a	15 5	10^{-6}	10^{-1}	—	K (14)
	Sh. flexneri 11 « R ». . . Sh. flexneri 20557. . . . Sh. flexneri 21712 « S » 2a	9 3 16	10^{-8}	10^{-3}	—	D (15)

Tableau II

Lysosensibilité de 16 souches de Sh. flexneri 2a aux 15 variantes phagiques

Variantes phagiques / Sh. flexneri type 2a	H (1)	(2)	M (3)	L (4)	E (5)	F (6)	J (7)	G (8)	C (9)	A (10)	B (11)	B1 (12)	I (13)	K (14)	D (15)
29/55	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	+
344/55	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
483/55	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—
517/55	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
599/55	+	+	—	—	—	+	—	—	+	+	+	+	+	-	+
643/55	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+
1197/55	+	·	—	—	—	—	+	—	—	+	+	+	+	—	+
369/56	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+
393/56	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+
99/57	+	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+
105/57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—
410/57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—
2354/57	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+	+	+	—	+
21550/58	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
21712/58	—	—	—	+	+	—	—	—	+	+	—	+	—	—	+
488/59	—	—	—	—	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+

Legende: — = lyse absente ou lyse +, 2 +, 3 + et OL (avec culture épaisse résistante)
+ = lyse confluente CL, lyse confluente avec culture fine résistante (CL) et semi-lyse confluente SCL

Dans le cas des phages H et (2), bien que les souches inductrices soient totalement différentes comme espèce (*Sh. flexneri 2a* No. 11 « *R* » et *Coli* « *Brx* » « *R* »), le spectre lytique des phages est identique (on a testé les phages H et (2) sur un plus grand nombre de souches que celui montré dans le tableau II, en obtenant des résultats strictement pareils). Soulignons que la seule ressemblance entre ces deux souches inductrices des deux variantes phagiques, consiste dans le fait que les deux sont des souches « R ». Ajoutons que le phage (2) provient du spécimen phagique 788, entraîné 2 fois sur *Sh. flexneri 2a* No. 11 « *R* » et induit par *Coli* « *Brx* » « *R* ». Il paraît que l'empreinte laissée par la *Sh. flexneri 2a* No. 11 « *R* » sur le spécimen phagique 788, est plus forte que les qualités d'induction du *B. coli* « *Brx* » « *R* », si bien que par la suite, l'adaptation du phage à cette dernière ne modifie en rien les qualités de la variante adaptée antérieurement à la souche *Sh. flexneri 2a* No. 11 « *R* ». Néanmoins, des données du tableau II il ressort que l'empreinte laissée par la souche de *Sh. flexneri 2a* No. 11 « *R* » peut quand même se modifier, vu que de la variante H, aussi bien que de la variante (2) on obtient les variantes L et E (respectivement M, F et J) qui ont des spectres lytiques totalement différents. Donc, des souches utilisées pour modifier les qualités lytiques du spécimen phagique 788, seule la souche de *B. coli* « *Brx* » semble ne pas avoir d'influence.

De plus, on constate que la variante phagique A lyse toutes les souches de *Sh. flexneri 2a*, tandis que la variante M n'en lyse aucune, bien que pour les deux variantes on ait utilisé, dans la dernière phase d'adaptation, la même souche inductrice de *Para-coli* 92. Par conséquent, on observe que dans la production des variantes phagiques, non seulement la souche inductrice peut pré-

senter son importance, mais aussi le phage en lui-même, avec toutes les qualités acquises au cours de son existence.

Au cours de recherches ultérieures, on essayera de trouver des souches microbiennes, capables de modifier les variantes M et A, par rapport à leur activité envers les souches de *Sh. flexneri 2a.* A remarquer que d'autres expériences effectuées (avec un nombre réduit de souches d'un autre type sérologique) ont montré que le phage A ne lyse pas certaines souches de *Sh. flexneri, variante X*; il en ressort que ses propriétés lytiques sont néanmoins limitées.

Du tableau II, on remarque facilement que chaque souche, à l'exception de deux (105/57 et 410/57) possède un spectre lytique différent. Pourtant, les spectres de lyse différents des 14 variantes phagiques, nous ont autorisé *à* croire que ces phages pourront être utilisés pour la lysotypie des souches de *Sh. flexneri 2a.*

Les recherches ont été continuées afin de déterminer la lysosensibilité de 66 souches *Sh. flexneri 2a*, envers les 14 variantes de phages non-dilués. Les résultats obtenus sont montrés dans le tableau III. On a considéré comme lyse: la lyse confluente (CL), la lyse confluente avec une fine culture résistante (CL), ainsi que la lyse semi-confluente (SCL), les notant par +. La lyse opaque avec culture épaisse résistante n'a pas été prise en considération; de même les différents dégrés de la lyse +, 2 +, 3+ et OL avec culture épaisse résistante ont été considérés comme lyse négative, et notés, ainsi que l'absence de la lyse par —. Tenant compte de ces indications la lecture des résultats se fait facilement.

Des données du tableau on constate (malgré l'emploi des phages non-dilués) une fragmentation des 66 souches de *Sh. flexneri 2a* (isolées de cas sporadiques) en 11 lysotypes et 18 sous-lysotypes. Jusqu'à présent, on n'a pas réussi à obtenir le lysotype h, raison pour laquelle, dans le tableau III, la rubrique respective n'a pas été complétée.

L'emploi des phages en dilution critique mènerait encore à une plus grande fragmentation du type sérologique 2a.

De tous les lysotypes, le lysotype c comprend le plus grand nombre de souches (31,3%), suivi par le lysotype d_2 avec 18,7%, j_4 avec 7,8%, b et d_1 avec 6,3% et g_1 avec 4,7%. Le reste des lysotypes comprend 1,5—3% des 66 souches.

Considérant la possibilité d'adaptation des phages isolés, on pourra obtenir de nouvelles variantes phagiques, ainsi que la fragmentation des lysotypes, qui comprendrait, éventuellement, un trop grand nombre de souches.

On trouve la majorité des souches isolées 2—3 années auparavant dans les lysotypes j, k et l, qui ont, d'ailleurs, le spectre lytique le plus étendu. Il se pourrait que le spectre lytique de celles-ci ne soit pas, dans la totalité des cas, le même que celui présenté à l'isolement, vu les modifications antigéniques, parfois importantes, subies par les B. dysentériques par les passages sur les milieux de culture. La valeur de ces suppositions pourra s'établir avec le temps, par la répétition de la lysotypie de toutes les souches récemment isolées, par passages répétés sur milieux de culture ou animaux de laboratoire.

Une méthode de lysotypie ne peut présenter de valeur que si les souches isolées d'une épidémie, ayant une seule source d'infection ou celles isolées à différents intervalles, d'une même personne, ont le même lysotype; de même si les souches isolées récemment des malades gardent le lysotype aux passages sur animaux.

Tableau III

Schéma provisoire de lysotypie des souches de Sh. flexneri type 2a

Lysotypes	Variantes phagiques														Nombre des souches contenues en lysotypes	Pourcentage des souches
	A	B	B_1	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M		
a	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1,5%
b	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	6,3%
c	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	20	31,3%
d d_1	+	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	6,3%
d d_2	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12	18,7%
e e_1	+	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	—	1	1,5%
e e_2	+	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1,5%
f	+	+	+	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	1	1,5%
g g_1	+	+	+	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	3	4,7%
g g_2	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	1	1,5%
h									?							
i	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—	—	—	—	1	1,5%
j j_1	+	+	+	—	+	—	+	—	+	+	+	—	—	—	1	1,5%
j j_2	+	+	+	—	+	—	—	—	+	+	+	—	—	—	1	1,5%
j j_3	+	+	+	+	+	—	+	—	—	+	+	—	—	—	1	1,5%
j j_4	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+	—	—	—	5	7,8%
j j_5	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	1	1,5%
j j_6	+	+	+	—	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	1	1,5%
j j_7	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	—	—	—	1	1,5%
k k_1	+	+	+	—	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—	1	1,5%
k k_2	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—	1	1,5%
l l_1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	2	3,1%
l l_2	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	1	1,5%
l l_3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	1	1,5%

Dans un prochain travail, nous présenterons les résultats de la lysotypie des souches de *Sh. flexneri 2a*, isolées de 4 foyers épidémiques (expérience en cours), en faisant une étude des souches qui serviront à l'infection des animaux de laboratoire.

CONCLUSIONS

1. Les bactériophages endogènes, isolés des souches lysogènes de B. Para-coli présentent de grandes possibilités d'adaptation, tandis que ceux obtenus des eaux d'égout ou des souches lysogènes de B. dysentériques, sont inutilisables.

2. Partant de quelques phages endogènes de *B. Para-coli* on obtient facilement, plusieurs variantes phagiques.

3. De 4 souches lysogènes de B. Para-coli on a isolé 4 phages. Avec ces spécimens phagiques, adaptés sur différentes souches de *Sh. flexneri type 2a* « *S* » et « *R* », *Sh. boydi*, *B. Para-coli* et *B. coli* « *Brx* » « *R* », on a obtenu 15 variantes phagiques.

4. Des 15 variantes phagiques obtenues, seulement 14 ont présenté un spectre différent d'une variante à l'autre.

5. La détermination de la lysosensibilité de 66 souches de *Sh. flexneri 2a*, isolées à partir de cas sporadiques de dysenterie, a mené à un schéma provisoire de lysotypie qui comprend 11 lysotypes et 18 sous-lysotypes.

6. On entrevoit la variation de la lysosensibilité des souches de *Sh. flexneri 2a*, en rapport avec la durée de conservation dans le laboratoire, par passages répétés sur milieux de culture, tenant compte des modifications antigéniques que celles-ci peuvent subir avec le temps.

7. De même, on entrevoit l'utilisation possible des bactériophages endogènes, obtenus de *B. Para-coli* lysogènes, pour la lysotypie d'autres types sérologiques appartenant au groupe *B. de Shigella*, ainsi qu'à d'autres groupes de *Shigella*.

J'exprime ma reconnaissance au Dr. Th. Meitert, pour les phages provenant des eaux de canal, qu'il a eu l'amabilité de mettre à ma disposition, ainsi qu'à Mmes Ileana-Tamba-Măldăresco et Maria Hudiacov, pour l'aide technique accordée.

BIBLIOGRAPHIE

1. Sartorius F. et Reploh H. — Zblt. f. Bakt. Orig., 1932, **126**, 10.
2. Evans A. C. — Publ. Health Rep., 1934, **49**, 386.
3. Craigie J. et Yen C. H. — Canad. Publ. Health J., 1938, **29**, 448.
4. Craigie J. — Canadian Publ. Health J., 1939, **30**, 137.
5. Felix A. et Callow B. R. — Brit. Med. J., 1943, **2**, 127.
6. Felix A. et Callow B. R. — Lancet 1951, **261**, 10.
7. Lilleengen K. — Acta Path. et Mikrob. Scand., 1948, Suppl. 77.
8. Felix A. — J. gen. Microbiol., 1956, **14**, 208.
9. Fisk R. T. — J. infect. Dis., 1942, **71**, 151.
10. Wilson G. S. et Atkinson J. D. — Lancet, 1945, **248**, 647.
11. Ciucă M., Combiesco C., Nestoresco N., Popovici M., Zilişteanu C, Nicolesco M., Stoian I. et Meitert T. — Bul. St. al Acad. R.P.R., 1953, **4**, 441.
12. Combiesco C. et Popovici M. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie. 1945—1947, **14**, 69.
13. Ciucă M. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1958, **17**, 161.
14. Nestoresco N., Popovici M. et coll. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1957, **16**, 69.
15. Manoliu N., Brailoiu A., Bustea Ch. et Stefănesco V. — Microbiol., Parazitol., Epidemiol., 1959, **2**, 118.

16. Nestoresco N., Popovici M, Filoti A. et Novac S. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1959, **18**, 537.
17. Hammarström E. — Lancet, 1947, **252**, 102.
18. Hammarström E. — Acta Med. Scand., 1949, Suppl. 223, 132.
19. Raška K., Malisova V. et Mosacek M. — Cas. Lek. les. 1950, **89**, 835.
20. Mayr-Harting. — J. gen. Microbiol., 1952, **7**, 382.
21. Ludford C. G. — Austr. J. exp. Biol. and Med. Sc., 1953, **31**, 545.
22. Schechter I., Cahan D., Tudoranu H., Bărzu M., Bercovici C. et Schertzer P. — Rev. Ig. Microbiol., şi Epidemiol., 1953, Nr. 2, 30.
23. Gaspar Gy. — Acta Microbiol., Acad. Scient., Hungaricae, 1958, **5**, 243.
24. Miczyslaw Metzger, Mulczik M., Protowska I. et Rudnicka I. — Arhivum Immun. i Therapia, Doswrodezalney, 1958, **6**, 621.

ЛИЗОТИПИЯ ШИГЕЛЛ I. ВРЕМЕННАЯ СХЕМА ЛИЗОТИПИИ *SHIGELLA FLEXNERI TIP 2a* ПРИ ПОМОЩИ ЭНДОГЕННЫХ ФАГОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ШТАММА ПАРАКИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ, АДАПТИРОВАННЫХ НА РАЗНЫХ МИКРОБАХ КИШЕЧНОЙ ГРУППЫ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Эндогенные фаги, выделенные из лизогенных штаммов паракишечной палочки, проявляют адаптируемость большой степени, в то время как фаги, полученные из сточной воды, или из лизогенных штаммов дизентерийной палочки, не применимы.

2. Исходя от нескольких эндогенных фагов паракишечной палочки, можно с легкостью получить много фаговых вариантов.

3. Выделены 4 фага из 4-х лизогенных штаммов паракишечной палочки. При помощи данных фагов, адаптированных на разных штаммах *Sh. flexneri* тип 2 а «S» и «R», *Sh. boydii* паракишечной палочки и кишечной палочки «Brx», «R» получены 15 фаговых вариантов.

4. Среди данных 15 фаговых вариантов, только 14 проявляют спектр различный от одного варианта к другому.

5. Определение лизочувствительности 66 штаммов *Sh. fleneri* 2a, выделенных из спорадических заболеваний дизентерией, дало возможность установить временную схему для лизотипии, состоящую из 11 лизотипов и 18 под-лизотипов.

6. Повидимому лизочувствительсть штаммов *Sh. flexneri* 2 а изменчива в связи с хранением в лабораторных. условиях, с повторными пасажами на питательных средах, имея в виду антигенные изменения, которые штаммы могут претерпеть во времени.

7. Повидимому успешное применение эндогенных бактериофагов, полученных из лизогенных паракишечных палочек, возможно и при лизотипии других серологических типов из B — группы шигелл, также как и для других групп шигелл.

DIE LYSOTYPIE DER SHIGELLEN. I. VORLÄUFIGES SCHEMA DER LYSOTYPIE VON *SH. FLEXNERI TYPUS 2-a* MIT HILFE ENDOGENER PHAGEN DES AN VERSCHIEDENE ENTEROBAKTERIAZEEN ANGEPASSTEN PARACOLI-STAMMES

ZUSAMMENFASSUNG

1. Endogene Bakteriophagen, die von lysogenischen Paracoli-Stämmen isoliert wurden, weisen ein sehr hohes Ausmass von Anpassungsfähigkeit auf, während die aus Kanalwässern oder aus lysogenischen Stämmen von Dysenteriebazillen erhaltenen, nicht verwendbar sind.

2. Von einigen endogenen Paracolibazillenphagen ausgehend, kann man mit Leichtigkeit viele Phagenvarianten erhalten.

3. Aus 4 lysogenischen Stämmen von *B. paracoli* wurden 4 Phagen isoliert. Durch Anpassung dieser Phagen an verschiedene Stämme von *Sh. flexneri* Typus 2a « S » und « R », *Sh. boydii*, *B. paracoli* und *B. coli* « Brx » « R » wurden 15 Phagenvarianten erhalten.

4. Von diesen 15 Phagenvarianten, weisen nur 14 ein von einer Variante zur anderen verschiedenes Spektrum auf.

5. Bestimmungen der Lysosensibilität bei 66 Stämmen von *Sh. flexneri* 2a, die von sporadischen Dysenteriefällen isoliert wurden, führten zur Aufstellung eines vorläufigen Lysotypieschemas, das 11 Lysotypen und 18 Untertypen einschliesst.

6. In Abhängigkeit von der längeren Aufbewahrung im Laboratorium durch wiederholte Überimpfungen auf Nährböden, ist, angesichts der Antigenänderungen, welche bei Stämmen von Sh. flexneri 2a im Verlauf der Zeit auftreten können, eine Variation der Lysosensibilität dieser Stämme abzusehen.

7. Gleichfalls abzusehen ist eine nutzbringende Verwendung der endogenen, von lysogenischen Paracolibazillen erhaltenen Phagen, bei der Lysotypie auch anderer serologischer Typen der B-Gruppe von *Shigella*, sowie auch anderer Shigellagruppen.

LYSOTYPING OF SHIGELLAE. I. PROVISIONAL PATTERN FOR THE LYSOTYPING OF *SH. FLEXNERI TYPE 2a* BY MEANS OF ENDOGENOUS PHAGES OF THE PARACOLI STRAIN ADAPTED TO VARIOUS ENTEROBACTERIACEAE

SUMMARY

1. Endogenous bacteriophages isolated from lysogenic strains of paracoli bacili display a very marked degree of adaptability, whereas those obtained from canal water or from lysogenic strains of dysenteria bacilli cannot be used.

2. From some endogenous paracoli phages many phage variants may readily be obtained.

3. Four phages were isolated from 4 lysogenic strains of paracoli bacilli. From these phages adapted to various strains of *Sh. flexneri* type 2a « S » and « R », *Sh. boydii*, *B. paracoli*, and *B. coli* « Brx » « R », 15 phage variants have been obtained.

4. Of the 15 phage variants, only 14 display a spectrum varying from one variant to another.

5. Lysosensitivity determinations in 66 strains of *Sh. flexneri* 2a isolated from sporadic cases of dysenteria led to a provisional pattern of lysotyping including 11 lysotypes and 18 subtypes.

6. The lysosensitivity of *Sh. flexneri* 2a strains appears to vary following prolonged storage in the laboratory, in relation to repeated passages on culture media, according to antigenic modifications these strains may undergo in the course of time.

7. It also appears that endogenous bacteriophages obtained from lysogenic paracoli bacilli might profitably be used in the lysotyping of yet other serological types of the *Shigella* B group as well as of other groups of *Shigellae*.

LYSOTYPIE DES SOUCHES DES *SHIGELLA FLEXNERI 2a* PROVENANT DE QUATRE FOYERS DE DYSENTERIE.

Note II

par

G. Istrati

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de la Dysenterie)

— Manuscrit reçu le 13 juillet 1959 —

Dans une note antérieure (1) on a exposé la méthode utilisée pour obtenir 15 variantes phagiques; à la suite des études effectuées sur la lysosensibilité de 66 souches de *Sh. flexneri 2a*, vis-à-vis de 14 de ces variantes, on a réalisé un schéma provisoire de lysotypie.

Le présent travail a pour but d'établir si des souches de *Sh. flexneri 2a*, isolées de différents foyers, présentent le même spectre lytique pour chaque foyer et si ces souches conservent leur spectre bactériophagique, après passages sur animaux de laboratoire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. On a étudié 74 souches de *Sh. flexneri 2a*, provenant de 4 foyers, reçues pour identification au Service de Dysenterie de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino », comme suit:

a) Trois souches provenant d'un petit foyer de dysenterie (5 cas) déterminé par un porteur (rég. de Constantza), (Foyer No. 1.).

b) Trente et une souches, isolées par le laboratoire du Centre antiépidémique d'Oradea Mare, pendant les mois de mars et d'avril 1959 (2 petites épidémies de contact: une intra-hospitalière (foyer No. 2) et une d'une collectivité fermée (foyer No. 3.).

Ces souches ont été testées pour la sensibilité aux antibiotiques par la méthode diffusimétrique (sur boîtes avec gélose), utilisant les antibiotiques mélangés à de l'amidon, ainsi que par la méthode des dilutions (milieu liquide). Antibiotiques utilisés: chloromycétine, auréomycine, streptomycine, pénicilline, hostacycline, érythromycine, polymyxine, néomycine. On a également testé la sensibilité au sulfathiazol et nitrofuran. Ces examens ont été effectués par le laboratoire du Centre Antiépidémique d'Oradea Mare et par le Service de Dysenterie de l'Institut « Dr. I. Cancacuzino » *).

c) Quarante souches, dont 39 de *Sh. flexneri 2a* et une souche de *Sh. flexneri, variante « X »*, isolées à Vulcan (Rég. Staline) **) (épidémie hydrique

*) Nous présentons nos remerciements à Mr. A. Gorea, qui a executé ces tests.
**) Nous exprimons notre reconnaissance à Mme. Henţiu, pour l'envoi de ces souches.

avec 66 cas apparus entre le 12 avril et le 28 mai 1959, dont 45 entre le 20 et le 26 avril). L'épidémie a été éteinte, à la suite des mesures appliquées, entre autre le chlorinage de l'eau. (foyer No. 4).

2. En plus, des souches isolées des 4 foyers mentionnés, nous avons étudié aussi 19 clones isolés d'une personne du Service de Dysenterie, contaminée à la suite d'une infection de laboratoire, pendant qu'elle travaillait à la préparation d'un vaccin avec 4 souches de *Sh. flexneri 2a* de 3 lysotypes différents.

3. Trente cobayes de 350—400 gr., dont 23 ont été infectés par voie conjonctivale (test de Sereny, 2, 3), avec différentes souches de *Shigella flexneri* 2a et 7 cobayes non-infectés, mis ensemble avec les animaux inoculés, dans le but, éventuel, de contracter la maladie.

4. Pour la lysotypie des 74 souches, on a utilisé les 14 variantes phagiques mentionnées, conformément aux indications données dans la note antérieure (1).

RÉSULTATS

1. Les 3 souches isolées du foyer de dysenterie de la région de Constantza, ont présenté le même lysotype: —« d_2 ». A remarquer qu'une de ces souches a été isolée du porteur qui paraît avoir déterminé ce foyer (Foyer No. 1).

2. La provenance des 31 souches isolées à Oradea Mare et étudiées par nous a été établie, conformément aux donnés de l'enquête épidémiologique, comme suit:

— 22 souches isolées de 18 malades, proviennent d'une épidémie intrahospitalière (foyer No. 2), qui a affecté surtout les nourrissons, la source d'infection paraissant être une soeur pédiâtre;

— 6 souches isolées de 6 malades, faisant partie d'une petite épidémie de contact d'une collectivité fermée (foyer No. 3). La source d'infection n'a pu être précisée;

— 3 souches isolées de 2 cas (1 malade et 1 porteur) sans relations épidémiologiques avec les 2 foyers.

Dans le tableau I, sont indiquées la répartition des lysotypes et la sensibilité aux antibiotiques de ces 31 souches.

Tableau I

Lysotypie et sensibilité aux antibiotiques de quelques souches isolées de la ville d'O., pendant les mois d'avril—mars 1959

Foyer de dysenterie	Nombre des cas	Souches isolées	Lysotypie		Sensibilité aux antibiotiques	
			Souches	Lysotype	Souches sensibles *)	Souches résistantes **)
No. 2	18	22	21	b	1	20
			1	c	0	1
No. 3	6	6	6	c	6	0
Cas isolés	2	3	1	b	1	0
			2	c	2	0

*) Chloromycétine, streptomycine, hostacycline, auréomycine, érythromycine, polymyxine et néomycine.
**) Chloromycétine, streptomycine, hostacycline, auréomycine, érythromycine, sulfathiazol et nitrofuran.

Des données du tableau I il ressort que toutes les souches, excepté une seule, appartenant à un même foyer, ont le même lysotype et se comportent de manière identique vis-à-vis des antibiotiques. A remarquer, qu'en répétant les coprocultures dans 4 cas, à différents intervalles, on a isolé des souches du même lysotype que celui des souches initiales.

Les souches provenant de l'épidémie intra-hospitalière, ainsi que la souche isolée de la soeur pédiâtre, qui semble avoir été la source d'infection, appartenaient au même lysotype « b ».

3. Les 40 souches de *Sh. flexneri*, isolées de 35 malades pendant l'épidémie hydrique, apparue dans la commune de Vulcan, appartenaient à 2 types sérologiques:

— *variante X* — 1 souche

— *type 2a* — 39 souches — dont 1 souche de lysotype « b », 19 de lysotype « c », 16 de lysotype « d_2 », 2 de lysotype « g_1 » et 1 souche de lysotype « j ». Cinq de ces souches ont été obtenues de 4 cas, par coprocultures répétées à différents intervalles. On a constaté que le lysotype de ces souches n'a pas varié, restant le même que celui des souches initiales.

Les résultats sont synthétisés dans le tableau II.

Tableau II

Répartition sérologique des lysotypes des 40 souches de Sh. flexneri 2a, isolées de l'épidémie hydrique de Vulcan

Type sérologique	Souches	Lysotypes:				
		b	c	d_2	g_1	j
2a	39	1	19	16	2	1
variante X *) .	1	—	—	—	—	—

*) Insensible envers tous les bactériophages.

4. La coproculture de la personne avec une infection de laboratoire, contractée au cours de la préparation d'un vaccin antiflexneri 2a, a donné sur milieu avec bile Istrati-Meitert, de fréquentes colonies, présentant l'aspect caractéristique des Shigella. Vu que le vaccin a été préparé avec 3 lysotypes différents, on a cherché à établir si l'infection avait comme origine un ou plusieurs lysotypes, en effectuant dans ce but des passages sur gélose inclinée des 19 colonies isolées. Ces 19 clones ont été lysotypés et testés sérologiquement. Les résultats sont montrés dans le tableau III.

Tableau III

Réactions sérologiques et lysotypie des 19 clones, isolés d'une infection de laboratoire (souche No. 614)

Souches infectantes et clones	Sérums adsorbés, de type et de groupe					Type antigénique	Lysotype
	I, III, IV, V, VI	II	3,4	6	7,8		
No. 614	—	++++ *)	++++	—	—	2a	d_3
1— 7**)	—	++++	++++	—	—	2a	d_2
8—19**)	—	—	++++	—		y	a

*) résultats des agglutinations sur lame
**) nombre des clones présentant les mêmes résultats

Les 19 clones ont présenté les lysotypes suivants:

— 7 clones le lysotype « d_2 » du même type sérologique (2a) que la souche infectante No. 614;

— 12 clones du lysotype « a » (lysés seulement par le phage A). Ce lysotype n'a pas été utilisé à la préparation du vaccin. Ces clones n'étaient plus agglutinés par les sérums spécifiques de type, mais seulement par le sérum agglutinant de groupe 3, 4. Des variations similaires de la *Sh. flexneri 2a* ont été décrites aussi par d'autres auteurs (4, 5). Ce changement de la composition antigénique, subi par la souche infectante, explique la modification de sensibilité des variantes dérivées vis-à-vis du phage. Ces variantes, en perdant l'antigène spécifique de type II, conservent néanmoins leur facteur pathogénique, vu que, inoculées sur la conjonctive oculaire du cobaye, elles déterminent une kérato-conjonctivite caractéristique.

5. Des 4 foyers étudiés on a pris, parmi les souches isolées qui avaient présenté 3 lysotypes, 2, 3 ou 4 souches de chaque foyer (en total 12 souches); on a infecté 12 cobayes par voie conjonctivale. A l'exception d'un seul, tous les animaux ont fait une kérato-conjonctivite typique, la maladie durant 14—18 jours avec guérison complète. Deux à trois jours après l'infection, on a effectué des ensemencements sur milieu avec bile sèche, isolant des *Shigella*, qui ont servi à l'infection de 11 autres cobayes. On a déterminé le lysotype des souches isolées des deux séries de cobayes, à l'aide de nos 14 préparations phagiques et on a constaté que toutes les souches ont conservé leur lysotype après les passages effectués. On a fréquemment observé que les cobayes infectés, par voie conjonctivale à un oeil, présentent aussi l'infection à l'oeil opposé. De même, quelques cobayes normaux, à la suite de la mise en contact prolongée (même bocal) avec les cobayes infectés, ont fait une kérato-conjonctivite. Deux souches isolées des cobayes infectés par contact ont présenté, comme on pouvait s'y attendre, le même lysotype que celui de la source d'infection.

DISCUSSION

Dans le but de préciser les sources d'infections nous nous sommes proposés d'étudier si les souches de *Sh. flexneri 2a*, transmises d'un individu à l'autre dans le cadre d'une collectivité, conservent leur lysotype, si les souches isolées de ces individus, à différents intervalles, continuent à appartenir au même lysotype et si les souches isolées des cobayes infectés, par voie conjonctivale, présentent les mêmes phénomènes.

Dans le cas des 3 foyers (Nos. 1, 2, 3) de dysenterie par contact, à l'exception d'une seule souche (foyer 2), toutes les souches d'un foyer appartenaient à un même lysotype. La souche qui faisait exception a été isolée d'un nourrisson (épidémie intra-hospitalière de contact): elle n'était plus lysée, après 90 jours, par aucun des 14 phages de notre set, perdant du point de vue sérologique l'antigène de type, ainsi que les antigènes de groupe. Cette souche, inoculée par voie conjonctivale n'est plus pathogène pour le cobaye; il est probable, qu'au moment de la détermination du lysotype, elle se trouvait dans une phase de transformation antigénique qui, ainsi que nous l'avons constaté expérimentalement dans d'autres cas, est décelable par les préparations phagiques et pas toujours par les réactions sérologiques.

A l'exception d'une seule, toutes les souches isolées de l'épidémie intra-hospitalière (foyer 2) ont été résistantes ou sensibles au mêmes antibiotiques;

ce test a confirmé les résultats obtenus par la lysotypie, affirmant sa valeur épidémiologique.

Les souches isolées des deux foyers d'Oradea Mare, diffèrent par le lysotype présenté, ainsi que par leur sensibilité aux antibiotiques (voir tableau I).

Dans l'épidémie hydrique (Vulcan) nous avons rencontré, ainsi qu'il était à prévoir, plusieurs types sérologiques, mais on aurait pu, tout aussi bien, se trouver en présence d'un seul type sérologique: 2a, qui prédomine en Roumanie. Dans ce cas on aurait dû préciser s'il ne s'agissait pas de plusieurs lysotypes. En effet, on a rencontré des épidémies de fièvre typhoïde provoquées par un seul lysotype (V. Russu (6)) ou par plusieurs lysotypes (cas plus fréquents). Les souches isolées de l'épidémie hydrique de Vulcan, appartenaient à 5 lysotypes: b, c, d, g et j. Cinq souches isolées des coprocultures répétées à différents intervalles ont présenté le même lysotype que celui de la souche initiale.

Dans le cas des clones isolés de l'infection de laboratoire, il ressort nettement que les souches de *Sh. flexneri 2a*, conservent leur lysotype, tant qu'elles gardent leur structure antigénique intacte. La modification de la structure antigénique, ainsi que la sensibilité aux phages, n'impliquent pas la perte des qualités pathogéniques, vu que les souches qui ont perdu leur facteur antigénique de type sont restées pathogènes pour les cobayes (7).

Infectant les cobayes avec différents lysotypes, on a constaté, après 2 passages, que les souches conservent le même lysotype. De même, des cobayes infectés par contact on a isolé des souches du même lysotype que celui de la souche initiale. Des résultats obtenus il ressort, que les souches de *Sh. flexneri 2a*, par passages d'individu à individu ou de cobaye à cobaye, gardent leur lysotype. Par conséquent, les souches de *Sh. flexneri 2a* paraissent, en général,e avoir une sensibilité stable, vis-à-vis des 14 préparations phagiques de notr set. On n'a constaté des exceptions que pour les souches qui ont changé ou sont en train de modifier leur structure antigénique. Dans ce cas, nous ne disposons pas de moyens plus sensibles que les préparations phagiques pour les mettre en évidence.

Il reste à élucider, ainsi que nous l'avons montré dans la note antérieure (1), si les souches, après conservation prolongée dans le laboratoire, ne présenteraient une sensibilité phagique différente de celle présentée lors de leur isolement, bien que leur structure antigénique soit apparemment intacte. Des observations de cet ordre donnent naissance à d'autres problèmes, qui nécessiteront des recherches qui puissent expliquer les modifications intervenues dans la structure antigénique.

La valeur de la lysotypie, des souches de *Sh. flexneri 2a*, à l'aide des 14 préparations, une fois établie, nous nous proposons d'étudier un plus grand nombre de souches isolées de différents foyers du pays, ainsi que de préparer de nouvelles variantes phagiques, avec des titres élevés et de sélectionner les préparations les plus adéquates à être utilisées en doses critiques.

Après avoir fixé un schéma définitif pour la lysotypie de *Sh. flexneri 2a*, nous passerons à l'étude par lysotypie d'autres types et spécimens de *Shigella*

CONCLUSIONS

1. Utilisant un set de 14 préparations phagiques pour la lysotypie de 74 souches de *Sh. flexneri 2a*, isolées de 4 foyers de dysenterie, ainsi que les souches isolées d'une infection de laboratoire, on constate:

a) Les souches de *Sh. flexneri 2a*, isolées de 3 foyers de contact, présentent un lysotype variant d'un foyer à l'autre et le même lysotype dans le cadre d'un même foyer. Ces résultats ont servi, dans deux cas, à la confirmation de la source d'infection.

b) Les souches isolées d'une épidémie hydrique de dysenterie, ont présenté 2 types sérologiques, les souches *Sh. flexneri 2a* se répartissant en 5 lysotypes.

2. Les souches, qui ont subi des passages sur des cobayes infectés expérimentalement ou spontanément (chez lesquels elles ont déterminé la kératoconjonctivite), ont gardé leur lysotype.

3. Les souches de *Sh. flexneri 2a*, isolées du même individu, à différents intervalles, ont présenté un lysotype stable.

4. Les souches de *Sh. flexneri 2a*, ayant modifié leur structure antigénique, changent également de lysotype.

5. La lysotypie effectuée à l'aide de 14 préparations phagiques du set provisoire s'est avérée utile en ce qui concerne la recherche de la filiation des cas de dysenterie et la détermination de la source d'infection, prouvant ainsi sa valeur épidémiologique.

De même, ces préparations se sont révélées utiles pour l'étude des modifications antigéniques des souches de *Sh. flexneri 2a*, qui ne sont pas toujours décelables sérologiquement.

BIBLIOGRAPHIE

1. Istrati G. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, ce même numéro, p. 85
2. Sereny B. — Acta Microb. Acad. Scient. Hung., 1955, **2**, 293.
3. Sereny B. — Acta Microb. Acad. Scient. Hung., 1957, **4**, 367.
4. Săsărman A. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1958, **17**, 309.
5. Gorea A. et Meitert T. — Communication personnelle, Bucarest.
6. Russu V. et coll. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1960, **19**, sous presse
7. Gorea A. et Măldăresco I. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1959, **18**, 245.

ЛИЗОТИПИЯ ШТАММОВ *SHIGELLA FLEXNERI* 2a В ДВУХ ОЧАГАХ. ДИЗЕНТЕРИИ II

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Применяя набор из 14 фаговых препаратов при лизотопии 75 штаммов Sh. flexneri 2a, изолированных в 4 очагах дизентерии и от больных с лабораторным заражением, установлено следующее:

а) Штаммы Sh. flexneri 2a, выделенные в 3 очагах контактной дизентерии, принадлежат к лизотипам различным от очага к очагу, но к тому же лизотипу в каждом очаге. Данные результаты послужили в двух случаях подтверждением источника инфекции.

б) Штаммы, выделенные из водной вспышки дизентерии, принадлежали двум серологическим типам и культуры Sh. flexneri 2a распределились по 5 лизотипам.

2. Штаммы, проведенные через организм экспериментально или самопроизвольно зараженных морских свинок (где они вызвали керато-конъюнктивит) сохранили лизотип.

3. Штаммы Sh. flexneri 2a, выделенные после разных сроков у того же человека, проявляют стойкие лизотипы.

4. Штаммы Sh. flexneri 2a, меняющиеся в отношении в отношении антигенной структуры, меняют также и лизотипы.

5. Лизотипия при помощи 14 препаратов нашего временного набора, оказалась полезной для прослежения последовательности заболеваний дизентерией и установления источника инфекции, доказывая таким образом эпидемиологическую ценность данного метода.

В то же время данные препараты оказались полезными для прослежения антигенных изменений штаммов, не всегда обнаруживаемых серологически.

DIE LYSOTYPIE VON *SHIGELLA FLEXNERI* 2*a*-STÄMMEN AUS VIER DYSENTERIEHERDEN. II

ZUSAMMENFASSUNG

1. Zur Lysotypie von 75 Stämmen von *Sh. flexneri* 2a, die aus 4 Dysenterieherden und von einer im Laboratorium infizierten Patientin isoliert worden waren, wurde ein Satz von 14 Phagenpräparaten verwendet. Es ergaben sich folgende Feststellungen:

a) Die Stämme von *Sh. flexneri* 2a, die aus 3 Herden von Kontaktdysenterie isoliert wurden, gehörten zu jeweils verschiedenen Lysotypen, innerhalb desselben Herdes jedoch zum gleichen Lysotypus. In zwei Fällen wurden diese Ergebnisse zur Bestätigung der Infektionsquelle benutzt.

b) Die aus einer auf dem Wasserwege verbreiteten Dysenterieepidemie isolierten Stämme gehörten zu 2 serologischen Typen und die Stämme von *Sh. flexneri* 2a waren auf 5 Lysotypen verteilt.

2. Bei Tierpassagen durch experimentell oder spontan infizierte Meerschweinchen (bei welchen sie eine Keratokonjunktivitis hervorriefen), erhielten die Stämme ihren Lysotypus unverändert.

3. Stämme von *Sh. flexneri* 2a, die in verschiedenen Zeitabständen vom gleichen Individuum isoliert wurden, wiesen stabile Lysotypen auf.

4. Stämme von *Sh. flexneri* 2a, die ihre Antigenstruktur ändern, ändern auch ihren Lysotypus.

5. Die Lysotypie mit Hilfe der 14 Präparate unseres provisorischen Satzes erwies sich bei der Verfolgung der Abstammung der Dysenteriefälle und bei der Auffindung der Infektionsquelle als nützlich, woraus ihr epidemiologischer Wert hervorgeht.

Desgleichen, waren diese Präparate wertvoll bei der Erfassung von antigenischen Veränderungen der Stämme von *Sh. flexneri* 2a, die nicht immer serologisch feststellbar waren.

LYSOTYPING OF *SHIGELLA FLEXNERI 2a* STRAINS ISOLATED FROM FOUR HEARTHS OF DYSENTERY. II

SUMMARY

1. Lysotyping by means of a set of 14 phage preparations was performed in 75 strains of *Sh. flexneri* 2a isolated from 4 hearths of dysentery and from one case of laboratory infection. The following findings were made:

a) The strains of the *Sh. flexneri* 2a isolated from 3 different foci of contact dysentery belonged to different lysotypes, while within the same hearth all strains belonged to the same lysotype. In 2 cases these results were used for a confirmation of the source of infection.

b) The strains isolated from a water-borne epidemic of dysentery belonged to 2 serological types, and the strains of *Sh. flexneri* 2a were distributed among 5 lysotypes.

2. After animal passages following the experimental or spontaneous infection of guinea-pigs (in which they induced keratoconjunctivitis), the strains maintained their lysotype.

3. Strains of *Sh. flexneri* 2a isolated at various intervals from the same subject displayed stable lysotypes.

4. Strains of *Sh. flexneri* 2a which changed their antigenic pattern, changed their lysotype as well.

5. Lysotyping by means of our provisional set of 14 preparations was helpful in following up the filiation of dysentery cases as well as in detecting the source of infection, and hence proved its epidemiological value. The same preparations proved useful in the investigation of antigenic changes in strains of *Sh. flexneri* 2a, which were not always detectable by serological means.

DISTRIBUTION DES TYPES BACTÉRIOPHAGIQUES DES STAPHYLOCOQUES PATHOGÈNES EN ROUMANIE

par

Marcela Popovici, Ecaterina Alexenco, Aurica Filoti et Stela Novac.

(Travail de la Chaire de Microbiologie II — Faculté de Spécialisation et Perfectionnement des médecins, I.M.F., Bucarest et Centre National des Bactériophages — Références — Institut « Dr. I. Cantacuzino »).

— Manuscrit reçu le 17 juin 1959 —

Si la différenciation des types de germes apporte une aide indiscutable à l'étude épidémiologique de toute maladie infecto-contagieuse, elle est d'autant plus utile lorsqu'il s'agit de germes largement répandus, tels les staphylocoques hébergés par les sujets sains (mais capables de provoquer des infections cliniques multiples et variées).

Les critériums de pathogénité sont encore un sujet à discussion; certains auteurs considèrent la production de coagulase comme le test le plus important, alors que d'autres donnent la priorité à l'élaboration de l'hémolysine.

Les études de Cowan, Christie et Keogh, et ensuite celles de Hobbs, essayant une classification sérologique, parviennent à établir une série de 13 types sérologiques. Cependant, la structure antigénique (insuffisamment connue) du staphylocoque, le nombre réduit de types susceptibles d'être différenciés, ainsi que le nombre élevé de réactions croisées entre les divers types, font que la méthode de la classification sérologique n'a pas donné jusqu'à présent, de résultats satisfaisants.

Actuellement, la différenciation à l'aide des bactériophages, malgré ses déficiences, constitue l'unique méthode capable de fournir des indications précieuses pour les investigations épidémiologiques, dans la découverte de la source d'infection, l'établissement du mécanisme de l'apparition des épidémies, ainsi que pour les mesures à prendre, en vue de la lutte anti-épidémique.

Les travaux antérieurs, effectués avec N. Nestoresco, ont souligné l'importance de certains lysotypes de staphylocoques, dans la détermination des infections spécifiques.

Des exemples dans ce sens, sont représentés par le lysotype 80, répandu surtout dans les infections chez les nouveau-nés et enfants en bas âge, ainsi que par le lysotype 77, agent infectant des brûlures.

D'autre part, on a constaté une relation entre les lysotypes de staphylocoques isolés des porteurs sains (personnel hospitalier) et des malades hospitalisés. Ceci nous a déterminé à étudier la distribution des lysotypes de staphylocoques pathogènes dans différentes conditions épidémiologiques, en Roumanie.

MATÉRIEL D'ÉTUDE

On a déterminé la sensibilité vis-à-vis de 21 préparations phagiques constituant le set de base de 3834 souches de staphylocoques pathogènes (considérés comme tels, par rapport aux tests classiques de pathogénité « in vitro »: production de coagulase et fibrinolysine, élaboration d'hémolysine, pigmentogénèse et fermentation de la manite).

Les souches étudiées, provenaient de:

1. Maternités et Unités hospitalières de la capitale et de 14 autres villes de diverses régions du pays.
2. Collectivités d'enfants bien portants (crèches et foyers d'enfants),
3. Population sans contact avec le milieu hospitalier.

Les souches ont été isolées:

— du rhino-pharynx et produits pathologiques de malades avec infections staphylococciques,

— du rhino-pharynx de sujets avec affections non-staphylococciques et de porteurs sains.

La lysotypie a été effectuée par la méthode décrite dans des travaux antérieurs (Nestoresco, Popovici, Novac, Cheptea et Alexenco, 1957), suivant les indications, techniques et interprétation, recommandées par le Laboratoire de Références pour le Staphylocoque, de Londres (Dr. Williams).

Résultats. A l'aide de la lysotypie, des staphylocoques isolés dans 12 maternités et 6 hôpitaux d'enfants, chez des nouveau-nés, enfants et mères, avec, ou sans infections staphylococciques, ainsi que du personnel hospitalier, on a pu constater la prévalence des staphylocoques appartenant au groupe phagique I et surtout du lysotype 80. Dans les cinq Services de chirurgie pour adultes, où l'incidence des lysotypes de staphylocoques a été contrôlée, on a observé néanmoins, la prédominance des lysotypes du groupe III (77, 77/75/53, 6/47/53/75, 7/42E /54/75), atteignant la proportion de 50%.

Etudiant comparativement, dans ces mêmes maternités et unités hospitalières d'enfants, l'incidence des lysotypes des staphylocoques isolés, d'une part chez les nouveau-nés et les mères avec affections staphylococciques et, d'autre part, des enfants et mères indemnes, ainsi que du personnel hospitalier, on a obtenu des différences marquées; dans le premier cas, les lysotypes du groupe I ont dépassé 2 à 3 fois l'incidence de ceux du groupe III.

Le tableau I reflète la distribution des lysotypes, parmi les sujets atteints de maladies staphylococciques et des porteurs sains, dans les maternités, hôpitaux d'enfants et services de chirurgie pour adultes.

Considérant seulement les souches de staphylocoques isolées des procès pathologiques, d'étiologie staphylococcique, sans tenir compte de l'âge des malades, on observe la prévalence nette du lysotype 80. En comparaison avec les souches isolées des malades, en dehors de l'hôpital, la prévalence de ce type parmi les souches provenant des malades hospitalisés est beaucoup plus accentuée. Les tableaux II et III montrent l'incidence des lysotypes de staphylocoques isolés chez les malades à infections staphylococciques, hospitalisés et non hospitalisés.

Ainsi qu'il ressort des tableaux II et III, 87% des staphylocoques, isolés des infections staphylococciques, en milieu hospitalier, appartenaient au lysotype 80, alors que parmi ceux isolés des infections staphylococciques en dehors de l'hôpital on a rencontré ce lysotype seulement dans 61,5% des cas, 17,5% pré-

Tableau I

Distribution des lysotypes en différentes conditions épidémiologiques

Unités hospitalières	Origine des souches	Réactions phagiques des souches de staphylocoque	%
Maternités	nouveau-nés avec inf. staph., mères avec mastites	Staphylocoques groupe I, lysotype 80	65,45
		Staphylocoques groupe II: 3A; 3C; 3A/3B	1,47
		Staphylocoques groupe III: 77;75/77;7/47 42E/53/54/75	21,32
		Staphylocoques groupe IV: 42D	0
		Staphylocoques non-typables	11,76
	nouveau-nés sains mères personnel hosp.	Staphylocoques groupe I: 52/52A/80; 52/80 lysotype 80 seul	30% 27,83
		Staphylocoques groupe II: 3C/71;3B/5571	7,06
		Staphylocoques groupe III: 77;53/77; 6/47/7, 53/54/75/77; 53/75/77	45,07
		Staphylocoques groupe IV: 42D	0,20
		Staphylocoques non-typables	17,67
Hôpitaux enfants	enfants et mères avec infections staphylococciques	Staphylocoques groupe I: 52A; 52/29 lysotype 80 seul	64,57 62,40
		Staphylocoques groupe II: 3A/3C; 3C/55	5,84
		Staphylocoques groupe III: 77; 75/77	20,00
		Staphylocoques groupe IV: 42D	0
		Staphylocoques non-typables	9,19
	personnel hosp., mères, enfants avec affections non-staphylococciques.	Staphylocoques groupe I: 29/52/79;29/525;2A/80 lysotype 80 seul	26,3 25
		Staphylocoques groupe II: 3C/55; 3A/3C; 3A/71	3,3
		Staphylocoques groupe III: 7/47/53/75/77	44,73
		Staphylocoques groupe IV: 42D	0
		Staphylocoques non-typables	25,47
Services de chirurgie pour adultes	malades avec affections staphylococciques	Staphylocoques groupe I: lysotype 80	24,06
		Staphylocoques groupe II: 3C/55; 3C/71	1,50
		Staphylocoques groupe III: 77; 53;6/47/53/75; 6/47/53/75	59,41
		Staphylocoques groupe IV: 42D	0
		Staphylocoques non-typables	15,03
	personnel hospitalier	Staphylocoques groupe I: 29/52/79/80; lysotype 80 seul	11,50 11,06
		Staphylocoques groupe II: 3A/55; 3C/55	14,65
		Staphylocoques groupe III: 77; 77/47; 75/47/ 53/77; 77/75/53	39,14
		Staphylocoques groupe IV: 42D	1,38
		Staphylocoques non-typables	33,33

ntant des réactions de groupe II, 10,5% groupe III et 10,5% non-typables.

Contrôlant les réactions phagiques des staphylocoques isolés des collectités d'enfants sains, crèches et foyers d'enfants, on a constaté une situation fférente de celle du milieu hospitalier, caractérisée par la prévalence des aphylocoques non-typables par les phages du set de base; suivent en second

Tableau II

Lysotypie des staphylocoques isolés des infections staphylococciques, en milieu hospitalier.

Procès pathologiques dont on a isolé les staphylocoques	Réactions phagiques des staphylocoques isolés	%
Furoncles, flegmons, pyodermites, eczémas, mastites, broncho-pneumonies, pleurésies, abcès pulmonaires, septicémies, entérites, toxi-infections alimentaires, ostéomyélites, otites, artrites, infections urinaires	Staphylocoques groupe I, lysotype 80	87
	„ groupe II: 3A/3B/3C; 3A/3B/3C/71/55	2
	„ groupe III: 77; 75/77; 6/42E/47; 7/47/42E/53/54 75/77/53	4
	Staphylocoques groupe IV:	
	Staphylocoques non-typables	7

Tableau III

Lysotypie des staphylocoques isolés des infections staphylococciques, en dehors de l'hôpital.

Procès pathologiques dont on a isolé les staphylocoques	Réactions phagiques des staphylocoques isolés	%
Furoncles, flegmons, artrites, angines, entérites, toxi-infections alimentaires, infections urinaires	Staphylocoques groupe I, lysotype 80	61,5
	Staphylocoques groupe II: 3A/3C/55; 55; 3A/3B/3C; 3C/55/71	17,5
	Staphylocoques groupe III: 6/7/54; 77; 75	10,5
	Staphylocoques groupe IV	0
	Staphylocoques non-typables	10,5

lieu, les staphylocoques du groupe I. Le tableau IV présente le comportement des souches isolées de pareilles collectivités, vis-à-vis des phages staphylococciques.

Tableau IV

Lysotypie des staphylocoques isolés dans les collectivités d'enfants sains

Réactions phagiques des souches de staphylocoques	%
Staphylocoques groupe I: 52/52A; 29/80;	32,21
lysotype 80 seul	30,80
Staphylocoques groupe II:	0
Staphylocoques groupe III: 77; 77/75/7/47/53/70/53; 42E/47/53/54/77	13,42
Staphylocoques groupe IV: 42 D	0
Souches non-typables	54,37

A part la distribution des lysotypes de staphylocoques chez les malades à infections staphylococciques, en milieu hospitalier, nous avons étudié comparativement la répartition des lysotypes parmi les staphylocoques isolés de divers sujets indemnes de toute affection staphylococcique et sans contact avec l'hôpital.

e tableau V, montre les réactions phagiques observées chez les souches de groupe.

Tableau V

ysotypie des staphylocoques isolés des adultes atteints d'affections non-staphylococciques, en dehors du milieu hospitalier

Réactions phagiques des souches de staphylocoques	%
taphylocoques groupe I, lysotype 80	5
taphylocoques groupe II: 3A/3B/3C/57/71; 55/71; 3A/3B	15
taphylocoques groupe III: 77; 70; 75; 7/42E/54/70	28,34
taphylocoques groupe IV: 42D	1,66
taphylocoques non typables	50

Il résulte de ce tableau que pour cette dernière catégorie, ce sont toujours es staphylocoques non-typables par les phages du set de base, qui prévalent. Contrairement aux collectivités d'enfants bien portants, où la première place armi les staphylocoques typables était détenue par ceux du groupe phagique , atteignant un pourcentage de 32,21%, dans cette dernière catégorie, les lysoypes du groupe I représentent seulement 5% et ceux du groupe III, 28,34% es souches.

DISCUSSION DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS

Des données exposées ci-dessus, il ressort que la distribution des lysotypes armi les 3834 souches de staphylocoques, dont la sensibilité aux préparations hagiques du set de base a été déterminée dans l'intervalle 1956—1958, variait n fonction de plusieurs facteurs.

Le premier de ces facteurs est l'âge. Les nouveau-nés et enfants en bas ge paraissent spécialement réceptifs pour les staphylocoques du groupe I, nstallés dans les maternités et hôpitaux d'enfants. Une situation similaire st signalée aujourd'hui dans la plupart des recherches.

En ce qui concerne la répartition des lysotypes du groupe I, celle-ci semble arier d'après les différentes régions géographiques. Ainsi, en Angleterre, Barber et Burston constatent, en 1955, la présence du lysotype 52A, Williams, n 1956, l'apparition récente du lysotype 80. Meyer, à Wernigerode (R.D.A.), onstate également dans les maternités, la prévalence du lysotype 52/52A/79/80.

En Roumanie, on constate la prédominance nette du type 80, situation imilaire à celle signalée par Phyllis Rountree, en Australie.

La prévalence du lysotype 80 parmi les staphylocoques isolés des infections taphylococciques, est également digne d'être retenue. Rountree, au VII-e Congrès de Microbiologie de Stockholm (1958), attire l'attention sur le nombre levé des infections staphylococciques dues au lysotype 80, qui, à partir de 1954, partiellement remplacé les lysotypes du groupe III.

Les recherches effectuées jusqu'à présent (Nestoresco, Popovici et coll., 957, 1958), sur les caractères de métabolisme, virulence et toxigénèse des souches e type 80, n'expliquent pas de manière satisfaisante cette prédominance dans détermination des procès infectieux. La remarquable capacité de diffusion ui pourrait expliquer la fréquente apparition de ce lysotype, surtout en milieu ospitalier, est toutefois prouvée.

Le mécanisme de cette diffusibilité et pathogénité particulières du lysotype 0, continue à représenter un problème qui nécessite des études approfondies.

BIBLIOGRAPHIE

1. Anderson S.E. et Williams R.E.O. — J. clin. Pathol. 1956, **9**, 24.
2. Barber M. et Burston J. — The Lancet 1955, **269**, 578.
3. Christie R. et Keogh E.V. — J. Path. a. Bact 1940, **51**, 189.
4. Cistovci G.N., Gordîskaia E.A., Kornilova N.M., Moiseva N.I., Polozova T.V., Terentieva T.A. et Sosina S.V. — Jurn. Microbiol., Epidemiol. i Immunol. 1953, **24**, No. 11, 55.
5. Ciucă M., nestoresco N., Popovici M., Alexenco E. et Novac S. — Z. Blatt f. Bakt. Parasit. Infektsk. und Hyg. Orig. 1958, **171**, 601.
6. Cowan S.T. — J. of Pathol. a. Bact 1939, **46**, 169.
7. Hobbs B. — J. Hyg. 1948, **46**, 222.
8. Meyer W. — Arztliche Wochenschrift 1957, **37**, 809.
9. Nestoresco N., Popovici M., Novac S., Cheptea A. et Alexenco E. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie 1957, **16**, 69.
10. Nestoresco N., Popovici M., Palade C., Novac S., Alexenco E., Cheptea A., Cociaşu I. et Stoica A. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie 1957, **16**, 507.
11. Nestoresco N., Popovici M., Alexenco E., Novac S. et Cheptea A. — Lucrările Congr. St. Med. Bucureşti 1957
12. Popovici M., Nestoresco N., Cheptea A., Novac S. et Alexenco E. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie 1957, **16**, 269.
13. Retchmenski S.S. et Szaneljiova A.P. — Jurn. Microbiol., Epidemiol. i Immunol. 1957, **28**, nr. 5, 55.
14. Rountree Ph. — Abstracts of Communications VIIth, Intern. Congress for Microbiol. Stockholm 1958,

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВЫХ ТИПОВ ПАТОГЕНЫХ СТАФИЛОКОККОВ В Р.Н.Р.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Изучали распределение лизотипов патогенных стафилококков в нашей стране, при разных эпидемиологических условиях — в родильных домах и больничных отделениях, в коллективах здоровых детей, среди населения не имеющего связи с больничной средой. Штаммы были выделены от больных со стафилококковыми и нестафилококковыми инфекциями и от здоровых носоглоточных носителей.

Лизотипия 3834 таких штаммов дала следующие результаты:

В родильных домах и детских больницах, среди детей и матерей, страдающими стафилококковыми инфекциями и среди персонала, отмечено преобладание стафилококков, принадлежащих к 1-ой фаговой группе и, главным образом, к лизотипу 80.

В хирургических отделениях для взрослых отмечено преобладание стафилококков, принадлежащих к III-ей фаговой группе.

Из общего количества штаммов патогенных стафилококков, выделенных из разных патологических процессов — фурункулов, маститов, флегмонов, абсцессов и т.д., в больничной среде, 87% принадлежали к лизотипу 80, в то время как среди штаммов, выделенных из внебольничных стафилококковвых инфекций, тип 80 выделялся только в 61, 5%, стафилококки II-ой группы выделялись в 17,5%, III -ей группы в 10,5% и нетипируемые стафилококки в 10,5%.

Среди больных с нестафилококковыми заболеваниями и вне больничной среды, стафилококки I-ой группы занимали лишь 5%, на первом месте находились нетипируемые стафилококки, затем стафилококки II-ой группы.

В коллективах здоровых детей, преобладали также нетипируемые стафилококки, за которыми следовали стафилококки I-ой группы.

Из вышеизложенных данных следует, что распределение лизотипов стафилококков, выделенных в нашей стране между 1956—1958-ом годом, было связано с возрастом, с больничной или внебольничной обстановкой и с выделением штаммов из стафилококковых инфекций или от здоровых носителей.

IE VERTEILUNG DER BAKTERIOPHAGENTYPEN PATHOGENER *STAPHYLOKOKKEN* IN RUMÄNIEN

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verteilung der Lysotypen pathogener Staphylokokken in unserem Lande, unter :rschiedenen epidemiologischen Bedingungen (Geburtsanstalten und Krankenhäuser, Kolktive gesunder Kinder, Bevölkerung ohne Beziehungen zum Spitalsmilieu), wurde an von ıtienten mit Staphylokokken und anderen Infektionen und von gesunden Nasenrachenägern isolierten Stämmen untersucht.

Die Lysotypie von 3834 solchen Stämme führte zu folgenden Ergebnissen:

In Geburtsanstalten und Kinderspitälern, unter Kindern, Müttern mit oder ohne Staphykokkeninfektionen und Personal, wurde das Vorherrschen von Staphylokokken der Phagen-uppe I und insbesonders des Lysotypus 80 festgestellt.

In chirurgischen Abteilungen für Erwachsene wurde das Vorherrschen von Staphykokken der Phagengruppe III beobachtet.

Von der Gesamtanzahl der pathogenen Staphylokokkenstämme, die aus verschiedenen ıthologischen Prozessen (Furunkel, Mastitis, Phlegmone, Abszesse, etc.) im Spitalsmilieu oliert wurden, gehörten 87% dem Lysotypus 80 an. Demgegenüber wurden von Staphykokkeninfektionen ausserhalb des Spitals, der Typus 80 nur in 61,5%, Staphylokokken :r Gruppe II in 17,5% und der Gruppe III in 10,5% und unbestimmbare Staphylokokken 10,5% der Fälle isoliert.

Unter den an nicht durch Staphylokokken verursachten Krankheiten leidenden Patienten ıd ausserhalb des Spitalsmilieus, war der Prozentsatz von Staphylokokken der Gruppe I ır 5%; an erster Stelle standen unbestimmbare Staphylokokken, gefolgt von solchen der ruppe II.

In Kollektiven gesunder Kinder herrschten ebenfalls unbestimmbare Staphylokokken)r, gefolgt von solchen der Gruppe I.

Aus diesen Daten geht hervor, dass die Verteilung der Staphylokokkenlysotypen, ährend des Zeitabschnitts 1956—1958, in unserem Lande, in Abhängigkeit vom Alter,)m Ort der Isolierung (Spitalsmilieu oder ausserhalb des Spitals) und je nach dem es sich m an Staphylokokkeninfektionen leidende Patienten oder um gesunde Träger handelte, eschwankt hat.

ISTRIBUTION OF BACTERIOPHAGE TYPES OF PATHOGENIC *STAPHYLOCOCCI* IN ROUMANIA

SUMMARY

The distribution of lysotypes of pathogenic staphylococci in this country was studied nder various epidemiological circumstances including maternity and other hospitals, collectities of healthy children, subjects in no way connected with hospitals. The strains were olated from patients suffering from staphylococcal or non-staphylococcal infections, and from ıe nose and throat of healthy carriers.

Lysotyping of 3834 strains yielded the following results:

In maternity and children's hospitals, among the children, mothers with or without aphylococcic infection, and the staff, staphylococci belonging to phage group I, and espeally to lysotype 80, were found to prevail.

In surgical departments for adults, staphylococci belonging to phage group III were)und to prevail.

Eighty-seven per cent of the pathogenic staphylococcus strains isolated from various ıthological processes (furuncles, mastitis, phlegmons, abscesses, etc.) in hospitals, belonged) lysotype 80, while among those isolated from staphylococcal infections outside hospital,) more than 61.5% belonged to type 80, staphylococci belonging to group II and III were)und in 17.5% and 10.5% of the cases respectively, and 10.5% were untypable.

Among patients displaying non-staphylococcic infections and outside hospital environents, staphylococci of group I occurred at a rate of only 5%, untypable staphylococci holding ıe first place, followed by those of group II.

In collectivities of healthy children, untypable staphylococci were likewise prevailing, llowed by those belonging to group I.

It results from these data that the distribution of lysotypes among staphylococci isolated our country during the period 1956—1958, varied according to age, intra- or extra- hospital ıvironments, and to the source of the strains (staphylococcal infections or healthy carriers).

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DES INCLUSIONS PROTO-LASMATIQUES DE LA MÉDULLO-SURRÉNALE DES COBAYES

par

C. Bonciu, R. Demetresco et Monica Petrovici

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service d'Anatomie Pathologique)

— Manuscrit reçu le 18 avril 1959 —

Celestino Da Costa en 1908 décrit chez les cobayes infectés expérimen-lement avec le virus rabique des corpuscules (inclusions) dans le protoplasma es cellules médullo-surrénales ressemblant à ceux décrits par Babeș-Negri ans le système nerveux central. Cet auteur attribuait à ces corpuscules une rigine rabique (7).

Segée, cité par Da Costa (7), confirme la présence de ces inclusions, mais outient qu'elles ne seraient pas identiques à celles des corpuscules de Babeș, ant dépourvues de leur structure fine caractéristique (granules fins, bleus, pandus dans la masse des corpuscules colorés en rouge intense — méthode de lann).

Gvormavigg et Elaut cités par Da Costa (7) signalent en 1924, la pré-nce de ces inclusions chez les cobayes injectés avec l'insuline et Hoen (7) 931) les trouve à son tour chez les cobayes inoculés avec la toxine diph-rique ou autres toxines microbiennes.

Hirai, (9) en 1929 et 1931, décrit, dans le protoplasma des médullo-rrénales des cobayes, 4 espèces différentes de granulations, dont trois liées la sécrétion d'adrénaline, la 4-e ressemblant à des granulations hyalines, rtement colorées en rouge par l'éosyne, en noir par l'hématoxyline ferrique Heidenheim) et à faible réaction chromique, rappelant les inclusions décrites ar Celestino Da Costa. Les mêmes inclusions ont été trouvées par Hirai ez le cheval, rat, lapin, chien, chat, porc et bovidés.

Celestino Da Costa, en collaboration avec Gualdes Barbo (7) reprennent s recherches (1946) et trouvent ces inclusions chez les cobayes inoculés avec toxine diphtérique ou la rage. A cette occasion ces auteurs constatent l'in-nstance de ces inclusions, absentes avant l'apparition des symptômes, aug-entant en nombre avec l'évolution de la maladie chez les cobayes inoculés ec le virus rabique. Quant aux cobayes injectés avec la toxine diphtérique ose mortelle), certains présentaient un nombre réduit de petites inclusions, ors que d'autres étaient négatifs, malgré les lésions dégénératives de la médullo-rrénale. Ces inclusions rondes, plus rarement ovalaires, sont de dimensions fférentes, atteignant ou dépassant la taille du noyau de la cellule médullo-rrénale, leur nombre variant souvent d'une inclusion à plusieurs. Com-ıcte, homogènes, très rarement formées de fins granules, pareilles à une orula ou à une vacuole centrale, elles sont souvent éosynophiles et rarement anophiles. Généralement, les cellules médullo-surrénales contenant ces inclusions

sont normales, présentant parfois des lésions dégénératives, et, dans certains cas, une vacuole dans le protoplasma où se trouvent une seule inclusion (habituellement grande) ou bien des inclusions fines multiples.

Selon de nombreux auteurs, ces inclusions seraient d'origine protoplasmatique, ressemblant à une réaction cellulaire vis-à-vis d'un parasite (virose latente), et dérivant des granules préexistant normalement dans le protoplasma. Cette réaction protoplasmatique est localisée, respectant souvent le noyau, ainsi que le reste du protoplasma et pouvant se trouver aussi dans les cellules à réaction chromaffine normale, capables d'enmagasiner le produit de la sécrétion adrénalinogène de la surrénale. Lors de la communication de Celestino Da Costa (7), Brumpt a fait remarquer que ces inclusions ressemblent aux formes évolutives des rickettsiae décrites par Carpano, Donatien et Sestaquard, Giroud, etc. donc, pouvant être de nature parasitaire.

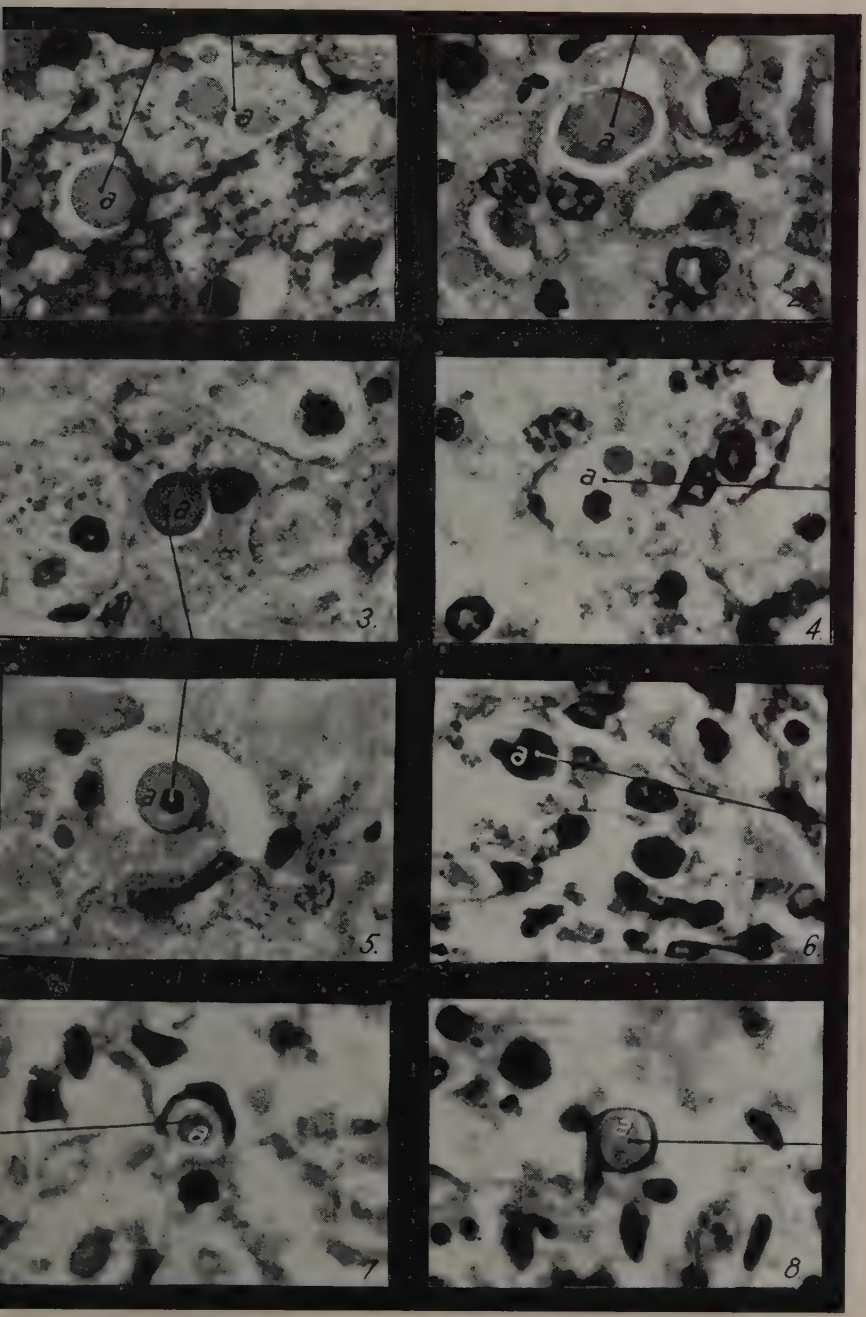
Oberndorfer (1909) a décrit, dans le protoplasma des cellules médullo-surrénales des sujets ayant succombé à des maladies infectieuses, des formations granulaires fines ou grandes, ressemblant aux inclusions protoplasmatiques, situées parfois à l'intérieur d'une vacuole. Cet auteur les assimile aux globules rouges phagocytés, alors que Lubarsch, Dietrich et Siegmund pensent qu'il s'agit d'une sécrétion pathologique (8).

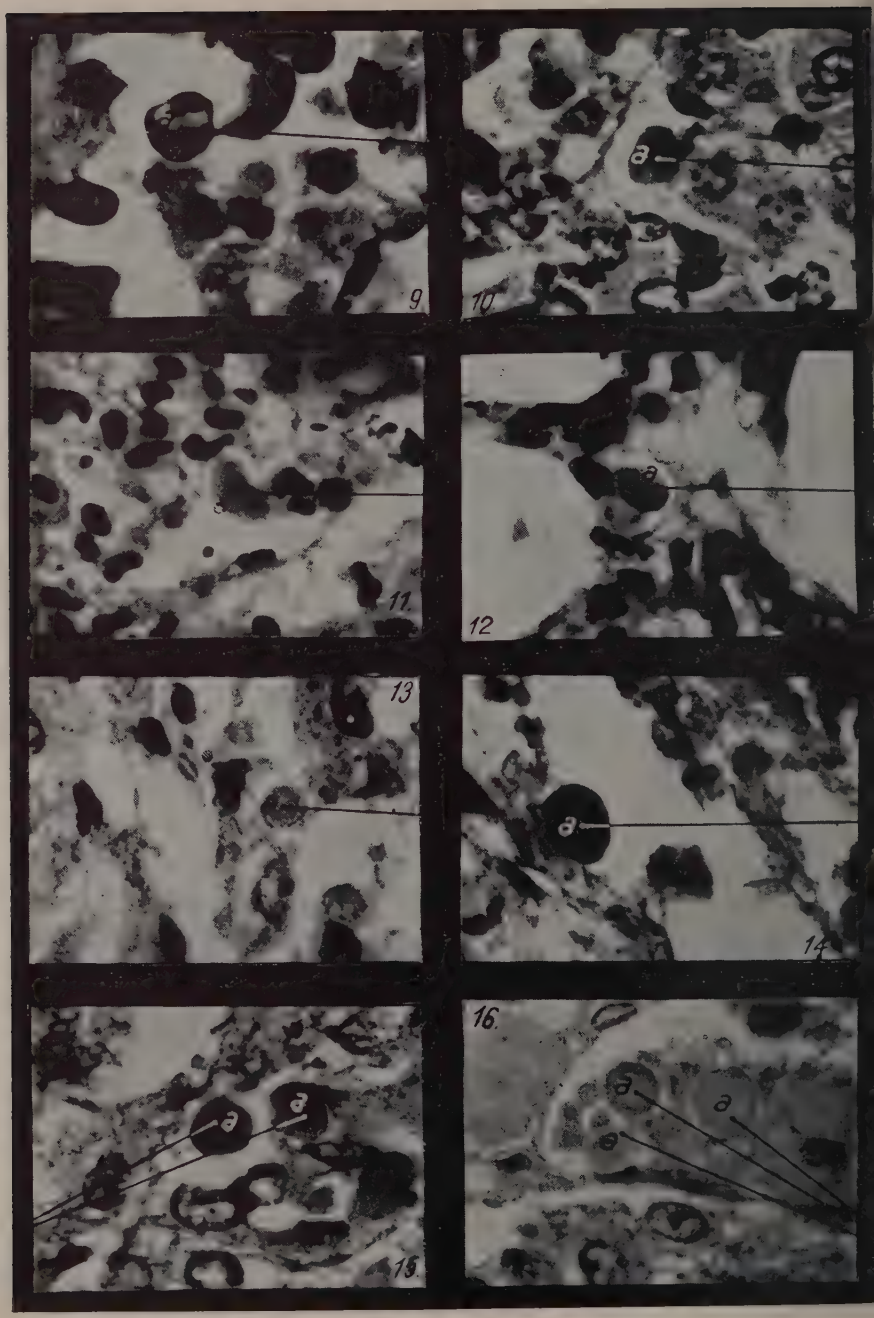
Selon Pawlikowski, (10) la sécrétion de l'adrénaline provenant du noyau des cellules médullo-surrénales, passe dans le protoplasma sous formes de granules fins, chromaffins et après leur élimination dans le sang, restent des vacuoles dans le protoplasma où, selon certains auteurs, se trouvent les inclusions décrites plus haut (sécrétion anormale, pathologique). D'après quelques investigateurs (Goldziehr, Sucksch, Olbreycht, Rand) dans les maladies infectieuses (surtout dans la diphtérie, autres maladies et brûlures), en dehors des lésions infiltratives, hémorragiques et dégénératives, on constate une réduction de la substance chromaffine des cellules médullo-surrénales (8) avec éventuelle apparition des inclusions protoplasmatiques, décrites plus haut.

★

Lègendes des micro-photographies.

1. Surrénale cobaye): inclusions protoplasmatiques dans les cellules de la corticale *(a)* — x 900
2. Foie (cobaye) inclusion protoplasmatique dans une cellule hépatique *(a)* — x 900
3. Surrénale (cobaye): inclusion protoplasmatique dans la médullaire *(a)* — x 900
4. Surrénale (cobaye): médullaire — 3 petites inclusions protoplasmatiques dans une même cellule, présentant des lésions évidentes *(a)* — x 900
5. Surrénale (cobaye): inclusion libre dans les capillaires sanguins de la médullaire, son centre hematoxilinophile intense, le reste éosinophile *(a)* — x 900.
6. Rate (cobaye): inclusions libres dans la pulpe rouge *(a)* — x900
7. Rate (cobaye): inclusions phagocytées par une cellule réticulo-endothéliale *(a)* — 900.
8. Rate (cobaye): inclusion phagocytée par une cellule réticulo-endothéliale *(a)* — x 900.
9. Rate (cobaye): trois petites inclusions phagocytées par une cellule réticulo-endothéliale *(a)* — x 900
10. Foie (cobaye): inclusion libre dans les espaces inter-trabéculaires *(a)* — x 900
11. Reins (cobaye): inclusion (déformée) libre dans les capillaires glomérulaires *(a)* — x 900
12. Poumon (cobaye): inclusion libre dans les capillaires sanguins des septs alvéolaires *(a)* — x 900
13. Surrénale (lapin): inclusion libre dans les capillaires sanguins de la médullaire *(a)* — x 900
14. Surrénale (mouton): inclusion libre dans les capillaires sanguins de la médullaire *(a)* — x 900
15. Surrénale (singe): inclusions protoplasmatiques et libres dans les capillaires sanguins de la médullaire *(a)* — x 900
16. Surrénale (homme) — inclusions protoplasmatiques et libres dans les capillaires sanguins de la médullaire *(a)* — x 900


a
a
a
2.
a
3.
a
4.
a
5.
a
6.
a
7.
a
8.


9
10
11
12
13
14
15
16

Nos recherches ont été les suivantes:

I. Examen histopathologique des organes pour le dépistage des cas à inclu-ons médullo-surrénales (surrénales comprises), éventuellement du système erveux central, de 1375 cobayes (250—700 gr) apparemment normaux ou pa-ıologiques, morts ou sacrifiés.

II. Emulsion des surrénales de cobayes (broyage et filtration) injectées ar différentes voies aux cobayes, rats, souris, afin de mettre en évidence l'éven-ıelle cause virotique ou microbienne déterminant les inclusions des médullo-ırrénales des cobayes.

III. Examen histopathologique des surrénales et de certains organes: 180 ›uris, 68 singes, 42 rats, 47 lapins, 30 chats, 26 bovidés, 34 chevaux, 53 gre-›uilles et 28 sujets.

I. Des 1375 cobayes examinés, 396 présentaient des inclusions pro-›plasmatiques et différentes lésions dans les surrénales; du reste des 979 cobayes ans inclusions) on a trouvé 760 avec diverses lésions dans les surrénales autres organes, et 219 cobayes normaux (sans lésions macro ou micros-›piques).

Les cas avec inclusions dans les surrénales sont répartis comme suit:

1. 29 cobayes avec péritonite fibrino-purulente et rate septique, dont 7 (93%) ont présenté des inclusions protoplasmatiques dans la médullo-ırrénale.

2. 10 cas de méningo-encéphalomyélite type Römer (1) dont 8 (80%) avec ıclusions;

3. 15 cobayes qui ont reçu des injections intrapéritonéales d'huile de paraffine, ıt présenté des paraffinomes (réaction massive dans toute la cavité abdominale), ›nt 12 cas (80%) avec inclusions;

4. 9 cobayes avec grands abcès dans la région lombaire et rate septique, ›nt 7 (78%) avec inclusions.

5. 13 cobayes inoculés avec des doses mortelles de toxine diphtérique, ›nt 10 positifs (87%) avec inclusions;

6. 92 cobayes, injectés avec différentes substances — (sels de bismuth, ·sénique et iode) ont présenté (lésion principale), une dégénérescence graisseuse ı foie, dont 62 cas positifs (68%).

7. 3 cobayes femelles, avec résorbtion de l'embryon par avitaminose E ?) dont deux cas positifs (67%).

8. 3 cas d'encéphalite, probablement de nature virotique, deux cas positifs ›7%).

9. 23 cobayes avec lésions expérimentales produites par les B. para-tuber-ıleux, 14 cas positifs (61%).

10. 30 cobayes avec hyalinose périfolliculaire splénique (3, 4) accompagnée 'autres lésions (tbc., pseudo-tbc., para-tbc., brucellose ou sans lésions); 48 cas ›sitifs (60%);

11. *a)* 5 cobayes inoculés avec le virus rabique de rue; 3 cas positifs (60%);
b) 5 cobayes inoculés avec le virus rabique fixe; 2 cas positifs 40%);

12. 47 cobayes avec lésions de septicémie (sans complications), 27 cas ›sitifs (57%);

13. 20 cobayes avec lésions pseudo-tuberculeuses, 8 cas positifs (40%);

14. *a)* 106 cobayes avec lésions pulmonaires aiguës (pneumoniques, broncho-pneumoniques, abcès), 40 cas positifs (38%);

b) 7 cobayes avec lésions pulmonaires chroniques, scléreuses, 1 cas positif (14%);

15. *a)* 233 cobayes avec lésions de tuberculose expérimentale généralisée, 81 cas positifs (35%);

b) 35 cobayes avec lésions tuberculeuses expérimentales, ganglionnaires, 6 cas positifs (17%);

16. 53 cobayes avec lésions brucelliques expérimentales (la plupart atténuées), 10 cas positifs (19%);

17. *a)* 239 cobayes avec présence de Klossiella dans les reins (phase sporogonique) et lésions correspondantes dans les autres organes (5), sans autres lésions; 44 cas positifs (18%);

b) 145 cobayes avec lésions d'origine klossiellique, sans parasites dans les reins (phase schizogonique simple) et sans autres lésions; 12 cas positifs (8%);

Les inclusions (corpuscules) dans la médullo-surrénale présentaient les caractéristiques suivantes:

a) leur fréquence oscille entre un nombre très réduit (parfois un seul corpuscule pour toute la section transversale) et un grand ou très grand nombre selon le cas et même d'une surrénale à l'autre.

b) De taille elles sont également très différentes variant entre la limite de visibilité ($\times 400$); plus grandes qu'un noyau de la cellule médullaire ou même d'une hématie — leur dimension peut varier dans la même cellule, dans la même surrénale ou d'une surrénale à l'autre.

c) La forme est généralement ronde, rarement ovalaire, d'aspect compact, hyalin, homogène, rarement avec structure fine granulaire ou de grandes inclusions, formées de 3—4 petits conglomérés; parfois on observe de grandes inclusions dans une vacuole protoplasmatique et très rarement on peut déceler une petite vacuole au centre d'une grande inclusion. Ces aspects peuvent varier dans la même surrénale ou d'une surrénale à l'autre.

d) Les inclusions sont plus résistantes à l'autolyse et putréfaction que les cellules médullo-surrénales, elles sont décelables dans les foyers hémorragiques parmi les éléments cellulaires entièrement détruits. Comme localisation, elles peuvent être intracellulaires (dans les cellules aréolées), dans les macrophages d'origine réticulo-endothéliale, ou libres dans les capillaires sinusoïdales de la médullaire. Les petites ou très petites inclusions isolées sont toujours intracellulaires, de répartition très variable et diffuse dans le protoplasma, alors que les grandes inclusions, uniques, peuvent être intracellulaires, soit intravasculaires. Très rarement les inclusions libres ont été trouvées dans les capillaires de la corticale et même dans un macrophage d'origine réticulo-endothélial, seules ou accompagnées de granulations ferriques.

e) Coloration:

1. Par la méthode à l'hématoxyline-éosyne, les inclusions sont colorées dans la majorité des cas, en rouge vif, variant parfois en intensité (rose, rouge pâle, rouge foncé, rouge orange, etc.), très rarement ces inclusions prennent des nuances plus ou moins intenses de l'hématoxylinophilie allant jusqu'au bleu violacé. Dans la majorité des cas, leur coloration est uniforme. On peut trouver cependant des inclusions de nuance rouge d'intensité variable (centre plus colore et marges plus pâles ou vice-versa); très rarement on a trouvé des inclusions

olacées (hématoxynophiles) avec marges rouges (en anneau) et inversement, ntre rouge et marges violacées. Dans le cas où la coloration à l'hématoxyline t intense, tous les éléments cellulaires se colorent plus ou moins intensément; ules les inclusions restent rouges.

2. Par la méthode de Mann, les corpuscules se colorent en rouge-mauve intensité variable, alors que les granulations éosinophiles des polynucléaires ennent une teinte rouge vif (aspect homogène ou granulaire) et les globules ie teinte rouge-orange. Les inclusions protoplasmatiques des cellules hépatiques, même que celles de la corticale surrénale, très rarement rencontrées dans nos cherches (micro 1 et 2), se colorent également en bleu foncé. Nous nous sommes uramment servis de cette méthode pour le diagnostic différentiel entre inclu- ons, polynucléaires éosinophiles et globules rouges. Sur les coupes anciennes, tous les autres éléments sont décolorés, les inclusions gardent longtemps leur inte rouge-mauve.

3. La coloration de Russel (pour les granulations hyalines) teint les inclu- ons en rouge-foncé.

4. Avec le Congo-rouge, elles se colorent en jaune, voire jaune-brun.

5. Avec le violet de gentiane et vert d'iode, les inclusions ne présentent s de métachromasie.

6. Avec l'hématoxyline ferrique (Heidenheim) les inclusions se colorent noir.

En dehors de ces inclusions, on rencontre très rarement dans le protoplasma s cellules surrénales ou dans les vaisseaux sanguins d'autres inclusions simi- res, mais qui ont leur propre couleur jaune, brun-verdâtre, rappelant celle la substance chromaffine qui ne se colore pas par les méthodes indiquées.

Des inclusions (corpuscules) pareilles en tous points à celles de la médul- -surrénale, se colorant par la méthode de Mann en rouge-violacé, ont égale- ent été trouvées dans d'autres organes et notamment:

1. *Rate.* Dans 22 cas on a décelé de rares ou très rares corpuscules (grands), res dans la pulpe rouge, mêlés à d'autres éléments sanguins. Quatre de ces s (les plus intéressants) présentent, en dehors des corpuscules libres, des rpuscules (un grand corpuscule par cellule) intra-macrophagiques, d'origine ticulo-endothéliale; dans deux on a trouvé en plus, de petits cor- scules (3—5) dans le protoplasma. Ces 4 cas correspondent à 2 paraffi- mes intrapéritonéaux massifs avec abcès, un cas de péritonite aiguë fibrinopu- lente, et enfin un quatrième, avec dégénérescence graisseuse massive du foie.

Reins. Trois cas avec de très rares corpuscules de grande taille (parfois formés) soit dans les capillaires glomérulaires (2 cas), soit dans les capillaires ertubulaires de la corticale.

Foie. Deux cas à très rares inclusions de grande taille dans les capillaires ertrabéculaires.

Poumon. Dix cas avec très grands corpuscules, parfois déformés, dans les pillaires des parois alvéolaires (2 cas avec foyers hémorragiques présentant s inclusions dans la paroi, de même que dans le lumen de l'alvéole). Dans ux autres cas à foyers de pneumonie aiguë avec cellules géantes multi- cléées, on a trouvé des inclusions, non seulement dans les capillaires septales, uis aussi dans le lumen des alvéoles et dans les cellules épithéliales alvéolaires squamées (macrophages).

Placenta. Dans un cas on a décelé de grands corpuscules dans les lacunes nguines.

Pancréas. Un cas avec de très rares grands corpuscules dans les capillaires de l'île de Langerhans.

Cerveau. Chez un cobaye inoculé avec le virus rabique de rue, on a décelé, au niveau de la corne d'Amon, dans une zone périvasculaire avec lésions dégénératives-hémorragiques-infiltratives et dépôt de granules de calcaire, de très rares corpuscules. Il est à mentionner que dans ce cas on a également trouvé des corpuscules de Babeș-Negri, colorés en rouge vif par la méthode de Mann, tandis que les inclusions protoplasmatiques sont colorées en rouge-mauve.

En ce qui concerne les lésions des surrénales qui accompagnent la présence des inclusions protoplasmatiques, nous mentionnons:

a) *Dans la médullaire :*

1. *Lésions infiltratives :* dans tous les cas, infiltration diffuse et médullaire (périvasculaire), d'intensité variable (très légère jusqu'à très intense), formée dans la majorité des cas, d'histiocytes et de lymphocytes, auxquels s'ajoutent parfois des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles et même des cellules plasmatiques·

2. *Lésions hémorragiques.* Foyers hémorragiques plus ou moins importants comme nombre et surface (13% des cas). Les cas les plus fréquents se trouvent chez les cobayes inoculés avec la toxine diphtérique; suit, en ordre décroissant, la maladie de Römer, septicémie, péritonite, rage, lésions pulmonaires aiguës, lésions tbc. et pseudo tbc., dégénérescence graisseuse du foie, brucellose. Ces foyers hémorragiques sont toujours accompagnés de lésions dégénératives, plus ou moins sévères, allant jusqu'à la destruction partielle du protoplasma et disparition du noyau.

3. *Les lésions dégénératives* ont été trouvées aussi en dehors de certains cas avec lésions hémorragiques concomitantes (20%), plus ou moins sévères, généralement d'intensité réduite, pouvant toutefois arriver jusqu'à la destruction des cellules médullo-surrénales.

Les cas les plus fréquents à lésions dégénératives ont été décelés dans les: septicémies, péritonites, tuberculose, dégénérescence graisseuse du foie, lésions inflammatoires aiguës du poumon et lésions para-tuberculeuses.

En général, l'intensité des lésions dégénératives, infiltratives et hémorragiques est proportionnelle au nombre et à la dimension des corpuscules; dans le cas de grands ou très grands corpuscules, avec lésions dégénératives prononcées et disparition du noyau, le protoplasma de la cellule respective disparaît presque totalement.

Les lésions infiltratives, dégénératives et hémorragiques se trouvent, dans la majorité des cas, dans les deux surrénales (pouvant varier toutefois comme intensité); parfois elles peuvent être présentes dans une des surrénales et absentes dans l'autre. En dehors des lésions décrites, mais étroitement liées à celles-ci, on a constaté, dans la majorité des cas, une réduction plus ou moins importante de la substance chromaffine des cellules médullo-surrénales, allant jusqu'à l'apparition et ensuite à la disparition de l'état aréolaire (vacuolaire) du protoplasma. Dans la plupart des cas, cette réduction ou disparition de la substance chromaffine est bilatérale et parfois unilatérale. L'état aréolaire du protoplasma des cellules est plus évident et plus intense chez les cellules à inclusions, notamment, lorsqu'elles sont de grande taille.

b) Les lésions des *corticales* sont toujours plus réduites que celles de la médullaire. Parfois ces lésions infiltratives de la médullaire passent dans la

orticale (dans la zone réticulaire et même dans la zone trabéculaire); on peut galement trouver des foyers hémorragiques et lésions dégénératives, spécialement hez les cobayes inoculés avec la toxine diphtérique ou dans la tbc. expérimentale. a multiplication des lipoïdes n'est pas en relation avec la présence des inclusions ans les cellules médullaires; elle dépend des lésions tbc. et de l'âge des cobayes. a présence du pigment jaune-brun dans les cellules réticulaires dépend généralement, de l'âge des cobayes (de plus de 400 gr). De même, la présence et nombre des macrophages ferriques, dans la zone réticulaire, ne sont pas és à l'apparition des inclusions dans la médullaire, étant dus à d'autres causes, urtout à l'infestation aux Klossiella (5).

Quant aux cobayes présentant des lésions dans les autres organes, sans nclusions dans les cellules médullo-surrénales, on a trouvé dans une proportion e 66% des lésions infiltratives discrètes (légères ou très légères) dans la médullaire t exceptionnellement, des lésions hémorragiques et dégénératives (4 cas avec ésions dégénératives simples et 5 autres avec lésions hémorragiques) en liaison vec des cas de diphtérie, tbc., septicémie et dégénérescence graisseuse u foie.

Dans les autres cas la corticale ne présentait pas d'aspects histo-pathologiques, auf dans le cas de multiplication des macrophages ferriques, des lipoïdes et ellules à pigment jaune-brun de la zone réticulaire, dus à la: tbc., âge des obayes ou lésions produites par les Klossiella.

II. Les surrénales de 28 cobayes (injectés par voie intramusculaire, en oses répétées de néosalvarsan, bismuth), prélevées de manière stérile, sont ectionnées en deux parties égales, dont l'une fixée dans du formol 10% pour examen histologique — chez 17 cobayes on a trouvé des inclusions dans la médullaire (61%) correspondant à une distrophie graisseuse hépatique massive, parfois ussi des foyers de pneumonie — et l'autre triturée stérilement dans un ortier, emulsionnée dans 200 ml solution saline 0,85%. L'émulsion est décantée près avoir été gardée pendant la nuit au frigidaire à + 4°; 1. la moitié est destinée ux inoculations; 2. le reste, centrifugé à 1000 t/m (pendant 15 minutes); le quide surnageant filtré par Seitz EK 40; 3. le sédiment est repris dans 100 ml olution saline 0,85% et additionné du reste de la solution I et II. Voici les ésultats obtenus:

Cobayes

1. *Emulsion filtrée. a)* 1 ml a été inoculé par voie intrapéritonéale, à 10 obayes sacrifiés entre 7 et 44 jours; examen microscopique: 1 cas (10%) positif, nclusions dans la médullo-surrénale correspondant à une péritonite purulente.

b) 1—2 ml par voie sous-cutanée à 11 cobayes, sacrifiés entre 7 et 45 jours; xamen microscopique: 1 cas (9%) positif, correspondant à une broncho-pneumonie avec cellules géantes multinucléées.

c) 1 ml par voie veineuse ou intracardiaque à 15 cobayes, sacrifiés entre et 48 jours; examen microscopique; 2 cas positifs (13%), correspondant à ne septicémie et à une pneumonie avec abcès.

d) 0,5 ml par voie intracrânienne, à 10 cobayes, morts entre 3 et 6 jours, u sacrifiés entre 17 et 18 jours. Examen microscopique: 1 cas (10%) positif, orrespondant à une méningite purulente avec abcès cérébral.

2. *Emulsion décantée. a)* 1 ml par voie sous-cutanée à 10 cobayes, sacrifiés ntre 10 et 34 jours; examen microscopique: 1 cas (10%) positif, correspondant une broncho-pneumonie avec septicémie.

b) 1 ml par voie intrapéritonéale, à 10 cobayes, sacrifiés entre 10 à 50 jours, examen microscopique: 1 cas (10%) positif, correspondant à une péritonite purulente.

3. *III-e émulsion.* Administration orale de l'émulsion par la sonde à 9 cobayes, sacrifiés entre 15 à 60 jours. Une dose quotidienne de 1 ml répétée trois fois, à 2 jours d'intervalle. Examen microscopique: négatif (0%).

4. Comme *témoins*, on a pris 36 cobayes, cliniquement normaux, (sacrifiés) du même groupe que ceux inoculés; examen microscopique: 4 cas (11%) positifs, soit un cas de dégénérescence graisseuse du foie, deux de broncho-pneumonie et 1 avec foyers pneumoniques à cellules géantes multinucléées.

Souris.

a) *Emulsion filtrée.* 0,5 ml administrés à 5 souris par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, ou 1 ml sous-cutané, sacrifiées après 10 à 30 jours; examen microscopique: négatif.

b) *Emulsion décantée.* 0,5 ml administrés à 10 souris par voie intrapéritonéale, ou 1 ml par voie sous-cutanée, sacrifiées entre 10 à 50 jours; examen microscopique: négatif.

Rats.

Emulsion décantée. Un ml administré à 6 rats, par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale, sacrifiés après 10 à 30 jours; examen microscopique: négatif.

III. En ce qui concerne la présence des corpuscules dans le protoplasma médullo-surrénal d'autres animaux ou individus, nous pouvons mentionner les résultats obtenus en examinant:

1. *Souris :* 180 souris cliniquement normales ou pathologiques; dans 12 cas, on a trouvé de rares ou très rares inclusions de dimensions réduites, intra ou extra-cellulaires dans la médullo-surrénale, accompagnées de légère infiltration et parfois de lésions dégénératives (2 cas) ou hémorragiques (1 cas). Ces 12 cas correspondent à: 2 cas de la maladie d'Armstrong, trois lésions pulmonaires aiguës, un abcès sous-cutané, deux cas avec lésions para-tuberculeuses généralisées, deux avec paraffinome intrapéritonéal et deux septicémies. En plus, 50 autres cas avec lésions infiltratives, très légères ou légères dans la médullo-surrénale.

2. *Rats :* 47 rats normaux ou pathologiques, dont 8 ont présenté de rares ou très rares inclusions intra ou extra-cellulaires, petites ou moyennes dans la médullo-surrénale, accompagnées de lésions infiltratives, relativement légères et parfois lésions dégénératives (2 cas). Ces 8 cas, correspondent à: 3 cas de résorption de l'embryon avec déciduom (avitaminose E), deux septicémies, deux avec foyers de pneumonie et un paraffinome intrapéritonéal. A part ces 8 rats, on a constaté chez 7 autres, de légères lésions infiltratives dans la médullo-surrénale.

3. *Lapins :* 47 lapins, cliniquement normaux et pathologiques, dont seulement 4 avec de très rares corpuscules (petits ou moyens) intra ou extra-cellulaires, accompagnés de lésions infiltratives dans la médullo-surrénale. Ces 4 cas correspondent à des lésions pulmonaires aiguës; en plus, chez 14 lapins, on a trouvé des lésions infiltratives, d'importance variable.

4. *Chiens :* les surrénales de 31 chiens de l'équarrissage, dont 4 cas avec rares corpuscules, petits et moyens, intra ou extra-cellulaires, accompagnés d'une légère infiltration. Dans 12 autres cas, on a trouvé de légères ou très légères lésions infiltratives.

5. *Singes :* 68 singes (cercopithèque) normaux ou pathologiques, dont avec rares ou très rares corpuscules moyens, extra ou intra-cellulaires, accompagnés de lésions infiltratives légères et un cas avec lésions dégénératives. Tous es cas correspondent aux lésions pulmonaires aiguës (foyers pneumoniques, ronchopneumonie, abcès). Chez 20 autres singes, on a constaté de légères ou ·ès légères lésions infiltratives dans la médullo-surrénale.

6. *Bovidés :* 26 bœufs, producteurs de sérums (anti-pasteurella et anti-ouget) de l'Institut Pasteur (Giulești). On a constaté 1 cas avec de très rares orpuscules moyens, intra ou extra-cellulaires, accompagnés de lésions infil-ratives légères, correspondant à une forte infiltration graisseuse du foie, sans utres lésions organiques.

7. *Moutons.* Sur 34 surrénales provenant du lot qui a servi à la préparation lu vaccin antirabique (Institut « Dr. I. Cantacuzino »), 15 (44%) ont présenté le très rares jusqu'à de fréquentes inclusions, de dimensions variables, intra ·u extra-cellulaires, accompagnées de lésions infiltratives plus ou moins impor-antes et dans un cas, des lésions dégénératives et hémorragiques.

Dans un cas, on a trouvé de rares corpuscules de grandes dimensions dans a pulpe rouge splénique; 4 autres cas ont présenté des lésions infiltratives dans la médullo-surrénale.

8. *Chevaux :* 38 chevaux, producteurs de sérum antidiphtérique (Institut Dr. I. Cantacuzino »), dont 3 cas avec de rares et très rares inclusions moyen-ıes et grandes, accompagnées de lésions infiltratives légères dans la médullo-urrénale, correspondant à des broncho-pneumonies.

9. *Chats :* les surrénales de 30 chats provenant de l'équarrissage, dont 3 à ›etites inclusions intra-cellulaires et légères lésions infiltratives.

10. *Grenouilles :* 50 grenouilles normales ou pathologiques. Dans aucun :as on n'a constaté d'inclusions protoplasmatiques dans les surrénales, sauf 8, qui ›nt présenté une légère infiltration.

11. *Homme :* les surrénales de 28 hommes et femmes, âgés de plus de 55 ans. Cinq cas (4 femmes, 1 homme) présentaient de rares inclusions petites et grandes, ntra et extra-cellulaires, accompagnées de légères lésions infiltratives, deux avec ésions dégénératives dans la médullo-surrénale et deux avec lésions infiltratives égères dans la corticale. A part les lésions scléro-atrophiques, propres à l'âge ıvancé, trois des cinq sujets présentaient une tbc. généralisée, un avec pneumonie obaire et un autre avec lésions septicémiques.

★

Il résulte de nos recherches que les inclusions protoplasmatiques de la médullo-surrénale des cobayes ne sont pas en liaison avec certaines viroses, mais se trouvent dans tous les cas à modifications physio-pathologiques et lésions des différents organes, dues aux causes les plus variées: viroses (rage, maladie de Römer, encéphalite), maladies microbiennes (péritonite, abcès, septicémies, diphtérie, tbc., para-tbc., pseudo-tbc., pneumonies aiguës et chroniques, etc.), maladies parasitaires (Klossiella), lésions produites par diverses substances chimiques (paraffinomes intrapéritonéaux, dégénérescence graisseuse du foie — par bismuth ou arsenic) et même avitaminose E.

Ces inclusions, en dehors de leur localisation habituelle dans la médullo-surrénale, intra ou extra-cellulaire (dans les capillaires sinusoïdaux), ont été mises en évidence aussi bien dans les capillaires sanguins des autres organes (corticales

des surrénales, poumons, reins, foie, pancréas, placenta, cerveau), que dans les foyers hémorragiques (surrénales, poumon), parfois dans les foyers inflammatoires même.

Elles ont été trouvées le plus fréquemment dans la pulpe rouge splénique, libres ou englobées (phagocytées) dans les cellules réticulo-endothéliales spléniques et parfois dans les cellules réticulo-endothéliales de la zone réticulaire des surrénales et même dans les cellules alvéolaires pulmonaires desquamées (foyers inflammatoires). Il semble, qu'après avoir circulé librement dans le torrent sanguin, elles sont phagocytées et détruites par le tissu réticulaire de la rate.

Au niveau de la médullaire des surrénales, ces inclusions sont toujours accompagnées de lésions infiltratives, plus ou moins importantes et par des lésions dégénératives des cellules de la médullo-surrénale (où elles se trouvent cantonnées), formant des amas importants, qui peuvent quelquefois arriver à détruire ces cellules. D'autres fois, elles ne font qu'accompagner les lésions hémorragiques de la médullo-surrénale.

Par la coloration de Mann, ces inclusions prennent une teinte rouge-mauve, caractéristique et différente, en quelque sorte, de la coloration rouge, que revêtent les hématies, les granulations éosinophiles et les corpuscules de Babeș-Negri.

En ce qui concerne l'origine de ces inclusions, du fait qu'elles sont présentes dans diverses maladies d'origine virotique ou microbienne, ainsi que dans différentes lésions déterminées par certaines substances chimiques (huile de paraffine, arsenic, bismuth) et nous basant, en même temps, sur les essais de passages négatifs sur les cobayes et autres animaux de laboratoire (par toutes les voies connues), nous sommes autorisés de conclure que ces lésions protoplasmatiques ne sont pas dues à une virose, ainsi que le soutiennent certains auteurs. Tenant néanmoins compte des lésions infiltratives et dégénératives au niveau de la médullo-surrénale et parfois, de la présence des inclusions ayant la même teinte que celle des granulations chromaffines du protoplasma des cellules médullaires contenant de tels corpuscules, nous considérons que ces inclusions sont produites par les troubles trophiques des cellules médullo-surrénales, en étroite liaison avec la sécrétion de l'adrénaline (origine distrophique, disendocrinie médullo-surrénale) et qu'elles ne sont pas caractéristiques pour certaines maladies.

De pareilles inclusions protoplasmatiques dans les cellules médullo-surrénales ont été régulièrement constatées chez d'autres animaux à sang chaud: souris, rats, lapins, chiens, bovidés, moutons, chevaux, chats, singes et même chez l'homme et par contre n'ont pu être mises en évidence chez les animaux à sang froid (grenouilles).

CONCLUSIONS

1. Les inclusions protoplasmatiques des médullo-surrénales des cobayes ne sont pas caractéristiques pour certaines viroses, pouvant se trouver dans différentes maladies microbiennes ou parasitaires, dans les avitaminoses et même dans les lésions organiques, produites par certaines substances chimiques.

2. Des inclusions du même ordre, ont été décelées dans la circulation sanguine, (dans les capillaires des organes) foyers hémorragiques et exceptionnellement dans les foyers inflammatoires.

3. Ces inclusions, après avoir circulé dans le courant sanguin, sont retenues dans la pulpe rouge splénique et phagocytées par les cellules réticulo-endothéliales. Exceptionnellement elles peuvent être décelées dans les cellules réticulo-

endothéliales de la zone réticulaire des surrénales et dans les cellules épithéliales alvéolaires pulmonaires desquamées.

4. La présence des inclusions protoplasmatiques dans la médullo-surrénale est accompagnée de lésions infiltratives, dégénératives et hémorragiques.

5. Par la méthode de Mann, ces inclusions se colorent en rouge-mauve caractéristique.

6. Ces inclusions d'origine distrophique, sont en liaison avec les granulations chromaffines et la sécrétion de l'adrénaline.

7. Ces corpuscules se trouvent chez les animaux à sang chaud et manquent totalement chez les animaux à sang froid.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bonciu C., Calalb G. et Petrovici Monica. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1957, **16,** 531.
2. Bonciu C., Clecner Bia et Margineanu A. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1958, **17** 63.
3. Bonciu C. et Popesco Ana. — Bul. Ştiinţ. Acad. R.P.R. 1952, **4,** 295.
4. Bonciu C., Clecner Bia, Greceanu Al. et Margineanu A. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1957, **16,** 131.
5. Bonciu C., Dincolesco M. et Petrovici M. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1958, **17,** 455.
6. Celestino da Costa A. — Bull. Acad. Méd. Paris, 1946, **130,** 392.
7. Dietrich A. et Siegmund H. — Handbuch der speziellen path. Anat. und Histologie (Henke F., Lubarsch I.) — Drüsen mit innerer Sekretion — I. Springer, Berlin, 1926, **8,** 1018.
8. Hirai M. — Transactions of the Japanese Pathological Society, 1929, **19,** 1 et 1931, **21,** 162.
9. Pawlikowski T. — C. R. Soc. Biologie, 1935, **120,** 469.

К ИЗУЧЕНИЮ ПРОТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ВКЛЮЧЕНИИ В МОЗГОВОЙ ЗОНЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ У МОРСКИХ СВИНОК

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Протоплазматические включения, находящиеся в мозговой зоне надпочечников у морских свинок, не свойственны определенным вирусным заболеваниям и могут быть обнаружены также при разных бактерийных или паразитарных заболеваниях, при авитаминозах и даже при органических поражениях, причиняемых некоторыми химическими веществами.

2. Такие включения наблюдали в свободном виде в кровяном току, в капиллярах органов, в геморрагических очагах и в виде исключения даже в воспалительных очагах.

3. Циркулируя в кровяном току, данные включения останавливаются в красной пульпе селезенки и фагоцитируются клетками ретикуло -эндотелаяльной системы. В исключительных случаях, включения обнаруживались в ретикуло-эндотелиальных клетках ретикулярной зоны надпочечников и в слущенных эпителиальных альвеолярных клеток легкого.

4. Наличие включений в протоплазме мозговой зоны надпочечника сопровождается инфильтрационными, дегенеративными и геморрагическими поражениями.

5. При окраске по Манну, данные включения принимают характерную красно-фиолетовую окраску.

6. Происхождение данных включений—дистрофическое, секреторное, в связи с хромафиновыми зернами и с выделением адреналина.

7. Включения обнаруживаются у теплокровных животных и оттсуствуют у холоднокровных.

BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER ZYTOPLASMACINSCHLÜSSE IM NEBENNIERENMARK DES MEERSCHWEINCHENS

ZUSAMMENFASSUNG

1) Die Zytoplasmacinschlüsse im Nebennierenmark des Meerschweinchens sind nicht für bestimmte Viruskrankheiten charakteristisch. Sie können auch bei verschiedenen mikrobiellen oder parasitären Erkrankungen, bei avitaminose und selbst im Falle gewisser, durch Chemikalien hervorgerufener organischer Schädigungen vorhanden sein.

2) Derartige Zelleinschlüsse konnten in freiem Zustand im Blutkreislauf der Organkapillaren, in haemorrhagischen und ausnahmsweise, auch in entzündlichen Herden nachgewiesen werden.

3) Nachdem sie im Blutstrom zirkuliert haben, werden diese Zelleinschlüsse in der roten Milzpulpa zurückgehalten und von den retikuloendothelialen Zellen phagozytiert. Ausnahmsweise konnten sie in den retikuloendothelialen Zellen der *Zona reticularis* der Nebenniere und in abgestossenen Epithelzellen der Lungenalveolen aufgefunden werden.

4) Die Anwesenheit der Zelleinschlüsse in der Nebenniere ist von infiltrativen, degenerativen und haemorrhagischen Schädigungen begleitet.

5) Bei der Mann-Färbung nehmen diese Zelleinschlüsse eine charakteristische rotviolette Färbung an.

6) Diese Einschlüsse sind dystrophischen, sekretorischen Ursprungs, im Zusammenhang mit den chromaffinen Körnchen und der Adrenalinsekretion.

7) Sie sind bei warmblütigen Tieren vorhanden und fehlen bei kaltblütigen.

CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF CYTOPLASMATIC INCLUSIONS IN THE MEDULLA OF THE ADRENAL GLANDS IN GUINEA-PIGS

SUMMARY

1. Cytoplasmatic inclusions in the medulla of the adrenal gland in guinea-pigs are not characteristic for certain viroses. They may be found as well in various microbial or parasitic diseases, in avitaminosis, and even in connexion with certain organic lesions caused by chemical substances.

2. Such inclusions could be demonstrated in a free state in the blood circulation in visceral capillaries, in haemorrhagic foci, and exceptionally even in inflammatory foci.

3. After being carried in the blood stream, these inclusions are retained in the red pulp and engulfed by reticulo-endothelial cells. Exceptionally they could be found in the reticuloendothelial cells of the *zona reticularis* of the adrenals and in desquamated pulmonary alveolar epithelia.

4. The presence of cytoplasmatic inclusions in the medulla of the adrenals is accompanied by infiltrative, degenerative, and haemorrhagic lesions.

5. These inclusions are characteristically stained reddish-purple by Mann's stain.

6. The inclusions are of dystrophic, secretory origin in connexion with the chromaffine granules and adrenaline secretion.

7. They are present in warm-blooded, and lacking in cold-blooded animals.

LES STAPHYLOCOQUES PATHOGÈNES CHEZ LES SCARLATINEUX

par

Coralia Baldovin-Agapi, Alexandrina Pasco, Valeria Henţiu, M. Migia, Florica Mihalco, E. Rişca, Eugenia Birţ, Leia Borşai et Coleta Georgesco

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino », Hôpital des Maladies Contagieuses et Laboratoire Régional d'Hygiène de la ville de S.)

— Manuscrit reçu le 28 avril 1959 —

Dans les conditions actuelles du traitement obligatoire des cas de scarlatine par la pénicilline, la présence des staphylocoques pathogènes chez ces malades, pose au moins deux questions:

1) La première, d'ordre général, se rapporte au rôle qui revient au Service de la Section de Scarlatine d'un hôpital de maladies contagieuses, dans la sélection des races résistantes de staphylocoques et des conséquences éventuelles, dues à la présence de ces souches (infections intra-hospitalières, réinfections, etc.).

2) La deuxième, d'ordre spécial, est de savoir, dans quelle mesure, les souches résistantes sécrétant de la pénicillinase, sont capables d'inactiver la pénicilline administrée aux malades.

A ce propos, nous avons étudié, du point de vue clinique et bactériologique 1415 cas de scarlatine, internés entre le 1 janvier et le 31 décembre 1957, à l'hôpital de maladies contagieuses de la ville de S. Plus de 50% de ces cas sont survenus pendant un crochet épidémique, enregistré dans l'intervalle des mois d'octobre-décembre.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les formes cliniques de scarlatine ont été: 1,3% frustes, 43,50% bénignes, 42,70% communes et 12,50% sévères. Les formes graves à allure toxique, où l'association de la sérothérapie s'est imposée, sont apparues après une épidémie de grippe.

Le taux des complications a été de 1,7%. Un seul décès a été enregistré.

Tous les malades ont été traités à la pénicilline cristalline, à raison de 400.000—800.000 U. par 24 heures, réparties en 4—6 injections, pendant 6 jours. La streptomycine a été associée dans 24% et le chloramphénicol dans 7% des cas, où l'amélioration escomptée n'était pas survenue après 3 jours de pénicilline.

L'hospitalisation a été de 6 à 8 jours dans 70% des cas, de 9 à 14 jours dans 23%, dépassant 15 jours pour le reste.

Des prélèvements de la gorge et du nez, en vue des examens bactériologiques, ont été pratiqués avant l'administration de l'antibiotique, après 3 à 4 jours de traitement et la veille ou le jour même de la sortie de l'hôpital. La recherche des streptocoques hémolytiques par ensemencements sur gélose-sang, a été poursuivie pendant toute l'année chez 1321 malades. La présence des staphylocoques a été contrôlée sur 660 malades, par des cultures faites parallèlement sur

le milieu Chapman et sur gélose-sang. Les souches de staphylocoques présentant les tests de pathogénité « in vitro » (coagulase, hémolyse, fibrinolysine, manite) ont été identifiées par lysotypie, à l'aide de 21 préparations phagiques de base, d'après la technique du Laboratoire de Références de Colindale (R. E. O. Williams)*). La résistance aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de la difusimétrie linéaire, à l'aide de disques imprégnés avec 200 γ de streptomycine, auréomycine, chloramphénicol, érythromycine, hostacycline et 15 U. pénicilline. La résistance à la pénicilline a été contrôlée de plus par la méthode des dilutions en tubes. Les souches résistantes ont été étudiées du point de vue production de pénicillinase, suivie du titrage de cet enzyme.

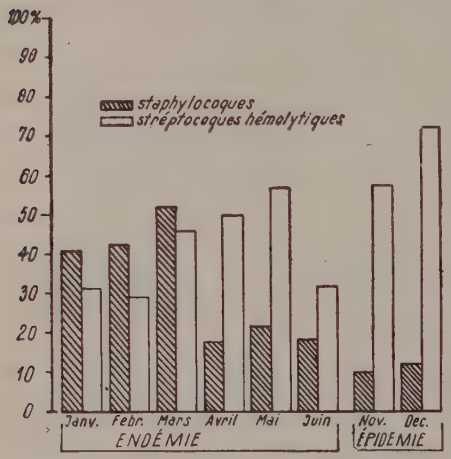


Fig. 1. — Proportion des examens positifs pour les staphylocoques pathogènes et les streptocoques hémolytiques par rapport aux saisons et à l'endémo-épidémicité de la scarlatine.

Résultats des examens bactériologiques. Les streptocoques hémolytiques ont été mis en évidence chez 54% des malades (en moyenne), avec 72% examens positifs, pendant le crochet épidémique. Quatre-vingt sept pour cent des souches, appartenaient au type épidémique A_1, le reste des souches représentant les types 4/24/29, 2, 6, 11/27, 12 et NT (non-typables).

Des staphylocoques à caractères de pathogénité, ont été trouvés chez 120 des 660 malades examinés à l'admission à l'hôpital, soit 18,30%. La localisation a été de: 36,7% dans le nez, 36,7% dans la gorge et 26,60% dans les deux régions à la fois.

Aux examens bactériologiques pratiqués après trois jours de traitement, 57 nouveaux porteurs de staphylocoques ont été découverts. Il est difficile de préciser s'il s'agissait de réinfections ou de la libération d'un germe absent lors du premier examen.

La fréquence relative des streptocoques hémolytiques et des staphylocoques pathogènes chez les malades de scarlatine, a donné les variations représentées dans la figure 1.

Une tendance saisonnière, en ce qui concerne le portage de staphylocoques, est évidente. Pendant les mois d'hiver, le taux des porteurs de staphylocoques variait entre 42% et 52%, tandis que pendant le printemps et l'été, le taux était deux fois moindre. Durant l'épidémie de scarlatine proprement dite, lorsque les examens positifs pour les streptocoques hémolytiques atteignent les valeurs maxima, les staphylocoques n'étaient présents que chez 10% des malades.

Ces constatations suggèrent que l'angine scarlatineuse pourrait exercer une certaine action antagoniste à l'égard des staphylocoques.

Les lysotypes de staphylocoques. Un nombre de 212 souches de staphylocoques pathogènes isolés des scarlatineux, pendant les diverses périodes de la

*) La lysotypie des staphylocoques a été effectuée dans le Laboratoire de Bactériophages Références de notre Institut, auquel nous adressons nos remerciements.

maladie (entrée à l'hôpital, séjour et sortie) ont été identifiées par lysotypie. Soixante-six pour cent des souches, appartenaient à 33 types ou combinaisons de types phagiques des groupes I, II et III, le reste étant non-typables.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau I.

Tableau I

Lysotypes de staphylocoques isolés des scarlatineux

Groupe phagique	Entrée		Séjour		Sortie	
	nombre	%	nombre	%	nombre	%
I	27	25,24	21	44,68	18	32,73
II	19	17,11	2	4,26	4	7,27
III	19	17,11	12	25,53	18	32,73
non-typables	45	40,54	12	25,53	15	27,27
Total	110		47		55	

Les souches de staphylocoques isolées au moment de l'admission, se groupaient du point de vue lysotypie comme suit: 40,54% souches non-typables, 25,24% groupe I et les groupes II et III, en proportions égales de 17,11%.

Pendant l'hospitalisation, la distribution des groupes phagiques de staphylocoques est modifiée. Certains groupes (I et III) présentent une tendance à devenir prédominants, tandis que les souches du groupe II et les non-typables, diminuent.

Ainsi, la proportion des souches du groupe II, a baissé de 17,11% à 4,26% après trois jours de traitement à la pénicilline.

La sensibilité aux antibiotiques. Nous présentons dans le tableau II la sensibilité à la pénicilline des souches de staphylocoques, isolées pendant les diverses périodes de maladie.

Tableau II

Sensibilité à la pénicilline des staphylocoques, appartenant aux divers groupes phagiques.

Groupe phagique	Entrée			Séjour			Sortie		
	nombre souches	Sensibles	Résistantes	nombre souches	Sensibles	Résistantes	nombre souches	Sensibles	Résistantes
I	26	14	12(46,15%)	20	1	19(95,00%)	18	2	16(88,88%)
II	19	19	—	2	2	—	4	4	—
III	19	3	16(84,22%)	10	—	10(100,0%	18	—	18(100,0%)
non-typables	41	32	9(21,95%)	11	6	5(45,45%	15	6	9(33,33%)
Total	105	68	37(35,34%)	43	9	34(79,00%)	55	12	43(78,18%)

Au début de la maladie, 35,34% des staphylocoques, en moyenne, étaient résistants à la pénicilline. Nous constatons, comme d'ailleurs d'autres auteurs, la prédilection pour la résistance à la pénicilline de certains lysotypes de staphylocoques. Ainsi, la proportion des souches résistantes, était de: 84,22% pour les souches du groupe III, 46,15% pour celles du groupe I, 21,95% des souches non-typables et zéro pour les 19 souches du groupe II.

Il existe une relation étroite entre le milieu fréquenté par les enfants et la proportion des staphylocoques résistants, hébergés. Le taux des souches résistantes à la pénicilline, était de 21,66% chez les enfants provenant du milieu familial, de 45,45% chez les enfants fréquentant des collectivités (crèches, foyers) et de 82% chez ceux internés dans un préventorium, où la pénicilline est couramment employée.

Le degré de résistance à la pénicilline était compris entre 100 et 1000 unités par ml. Approximativement 38% des souches se développaient à des concentrations de 500 ou 1000 unités pénicilline par ml.

Toutes les souches résistantes sécrétaient de la pénicillinase, en quantités correspondantes à leur degré de résistance.

Après 3 à 4 jours de traitement, 79,00% des souches (en moyenne) étaient devenues résistantes à la pénicilline. Cette fois-ci, 100% des souches du groupe III, 95,0% du groupe I et 45,45% des souches non-typables étaient résistantes, tandis que les souches du groupe II, étaient pratiquement éliminées.

En même temps, 55,0% des souches résistaient à des concentrations de pénicilline variant entre 500 et 1000 unités par ml.

La résistance envers les autres antibiotiques est représentée dans le tableau III.

Tableau III

Résistance des staphylocoques aux divers antibiotiques suivant la durée de l'hospitalisation

	Pénicilline	Streptomycine	Auréomycine	Chloro-mycétine	Erythro-mycine	Hostacycline
entrée . .	35,34	58,20	9,50	16,50	4,00	6,00
séjour . .	79,00	83,90	21,50	17,80	3,70	28,00
sortie . .	78,18	81,10	26,20	21,70	1,94	23,10

La résistance à la streptomycine a évolué parallèlement à celle de la pénicilline. Peu de souches ont été résistantes à l'auréomycine, érythromycine et hostacycline, la proportion ayant augmenté de 2 à 3 fois pour les antibiotiques, utilisés justement en vue du traitement des porteurs de staphylocoques.

Manifestations dues à la présence des staphylocoques chez les scarlatineux. Les staphylocoques pathogènes n'ont exercé aucune influence sur l'évolution clinique de la maladie et n'ont pas provoqué de staphylococcies graves dans la section de scarlatine.

Les formes cliniques de maladie étaient pareilles chez les malades avec ou sans staphylocoques. Des complications pyogènes cutanées bénignes à staphylocoques, ont été enregistrées chez 2,2% des malades.

Le nombre des cas de réinfection avec d'autres lysotypes de staphylocoques a été très réduit (7 cas), se manifestant chez les malades dont l'hospitalisation avait dépassé 10 jours. Cinq de ces malades se sont réinfectés avec d'autres lysotypes, après élimination de la souche initiale. Chez les deux autres, la souche de réinfection s'est superposée à la souche initiale, résistante ou devenue résistante à la pénicilline.

A la sortie de l'hôpital, 33,0% des 177 malades ayant été porteurs de staphylocoques hébergeaient encore le germe dans le rhino-pharynx. Le taux des convalescents de scarlatine, porteurs de staphylocoques a été, en général, de 1,37%.

La disparition des staphylocoques a été en rapport avec la résistance des ouches. Les porteurs de souches sensibles à la pénicilline sont devenus négatifs ans 82,0% des cas, tandis que ceux avec des souches résistantes sont devenus égatifs dans une proportion de 35,0%. Cette constatation n'est point surpre-ante, étant donné le degré élevé de la pénicillino-résistance des souches. Dans es cas, même l'association d'autres antibiotiques (auréomycine, biomycine ou loramphénicol) n'a pas donné de résultats.

L'inactivation de la pénicilline par les staphylocoques résistants sécrétant de pénicillinase. Jusqu'à présent la sensibilité des streptocoques hémolytiques la pénicilline n'a pas été démentie. Néanmoins, Tunevall, Colebrook et utres auteurs, ont constaté que les streptocoques du rhino-pharynx ou des aies chirurgicales ne sont pas influencés par la pénicilline lors d'une association staphylocoques résistants, sécrétant de la pénicillinase. Ce fait est attribué l'inactivation de la pénicilline « in situ » par la pénicillinase staphylococcique.

D'après Balş (3) et Roman et Hotnog (10), cette possibilité serait assez re. Selon leurs observations portant sur 535 cas de scarlatine, 72 malades pré-ntaient dans la gorge des streptocoques hémolytiques en même temps que es staphylocoques pénicillinase-positifs. La pénicilline sanguine et urinaire a été inactivée par la pénicillinase intra et extra-cellulaire, élaborée par les aphylocoques que dans 3 de ces cas.

N'ayant pas eu la possibilité de titrer la pénicilline sanguine ou d'effectuer es recherches sur la pénicilline excrétée dans l'urine, nous avons apprécié son fficacité d'après un critérium indirect, c'est-à-dire, par la recherche des strep-oques hémolytiques dans le rhino-pharynx.

Nous avons constaté que le pourcentage des malades qui ont quitté l'hôpital orteurs de streptocoques hémolytiques a été de 1.53% (17 sur 1109 malades xaminés), le streptocoque A_1 (type épidémique majoritaire) étant mis en évidence ez 16 des 17 convalescents. Les staphylocoques étaient associés au streptocoque ans 0,54% des cas, tandis que 0,99% hébergeaient le streptocoque seul. Les ouches de staphylocoques associés (6 cas) étaient modérément résistantes ou ême sensibles à la pénicilline. Les streptocoques se trouvaient en même temps ans le nez et dans la gorge dans 4 cas, dont deux avec des streptocoques seuls deux avec des streptocoques associés aux staphylocoques. Ceci indiquerait ue la pénicilline a été empêchée d'exercer son influence plutôt par des nomalies locales du rhino-pharynx que par une inactivation par la pénicil-nase staphylococcique.

DISCUSSION

La proportion des scarlatineux, porteurs de staphylocoques pathogènes ans le rhino-pharynx, constatée par nous se situe dans les limites normales, vec des variations entre 52,0% pendant l'hiver et 18,0% pendant l'été. Il est noter que la tendance saisonnière de portage peut être influencée par l'angine carlatineuse, puisque au moment de l'incidence maxima d'une épidemie de carlatine à streptocoques A_1, le nombre des malades porteurs de staphylo-oques, a été très réduit.

La répartition des souches de staphylocoques par groupes phagiques, est areille à celle trouvée par Nestoresco et Popovici chez les porteurs sains ,9) et par nous-mêmes (2) en Roumanie, ainsi que par Williams et Rippon .7) en Angleterre. La résistance initiale aux antibiotiques des souches de staphy-oques est en relation avec le milieu fréquenté par les enfants, la proportion

des souches résistantes à la pénicilline pouvant atteindre 82% dans les collectivités fermées. De ce point de vue, le rôle de ces collectivités dans la sélection des souches résistantes est comparable à celui de l'hôpital (1). Pour limiter la diffusion de ces souches résistantes et prévenir les infections intra-hospitalières, il est recommandable d'isoler dans des salons séparés, les malades provenant des collectivités fermées.

L'administration de la pénicilline, en dehors de l'hôpital, a donné lieu en même temps, à des réactions de sensibilisation à l'antibiotique chez certains de ces enfants. Des 1415 malades, 65 ou 4,70% ont eu des réactions de sensibilisation à la pénicilline, manifestées soit par des réactions locales, soit par des réactions générales de type urticarien ou de fièvre « sine causa » qui cessaient lors de l'interruption de l'antibiotique. Du total des réactions de sensibilisation, 94,64% sont apparues chez 13,50% des 452 malades qui avaient été traités antérieurement à la pénicilline, et seulement 6,36% chez les 963 malades qui n'avaient pas reçu de pénicilline.

On a constaté également au cours de ce travail des relations entre la résistance aux antibiotiques et les lysotypes de staphylocoques, signalées par de nombreux auteurs. Elwood (1951), Rountree (1953), Williams, Rippon et Dowsett (1953), Vogelsang (1953, 1954), Wallmark (1954), Bynoe, Elder et Courtois (1956), ont remarqué que les staphylocoques du groupe III, isolés dans les hôpitaux, sont résistants à la pénicilline en proportion de 50,0% à 90,0%. Les travaux de Schmidt et Lenk (1958) et Ortel (1958) montrent, que la grande majorité des souches sensibles appartiennent aux lysotypes du groupe II.

Dans nos observations, la proportion des souches résistantes à la pénicilline est de 100% pour le groupe phagique III et 95% pour le groupe I, tandis que les lysotypes du groupe II se sont maintenus sensibles. En même temps, le nombre des souches des groupes III et I a augmenté pendant l'hospitalisation, alors que les souches du groupe II ont pratiquement disparu.

La prévalence de certains lysotypes de staphylocoques comme conséquence de l'utilisation des antibiotiques est en général attribuée à un processus de sélection des souches résistantes au détriment des souches sensibles. Nous avons toutefois assisté, dans maints cas, à une augmentation progressive de la résistance des souches isolées successivement d'un même malade.

La sélection des lysotypes de staphylocoques résistants (groupes III et I) et la disparition des lysotypes sensibles (groupe II) s'est effectuée rapidement, après 3 à 4 jours de traitement à la pénicilline. Nous soulignons, en même temps, le degré considérable de résistance, présenté par la plupart des souches isolées surtout après traitement.

La négativation des staphylocoques du rhino-pharynx des malades, nécessite une discussion spéciale, vu que la sensibilité ou la résistance des souches à la pénicilline, ainsi que les conditions anatomiques locales (du rhino-pharynx) ne suffisent pas à expliquer dans tous les cas, la disparition ou la persistance de ces germes. La disparition des souches sensibles, sous l'effet de l'antibiotique, est naturelle. La persistance des souches sensibles ou résistantes chez les malades, présentant une hypertrophie des tissus lymphoïdes pharingiens, peut être attribuée à l'inaccessibilité de l'antibiotique « in situ », tandis que la disparition des souches résistantes à des quantités de pénicilline irréalisables du point de vue thérapeutique ne peut s'expliquer que par l'intervention d'autres mécanismes, qui dépendent plutôt de l'action de l'organisme que de l'antibiotique.

Le fait que les staphylocoques pathogènes, parmi lesquels le type 80, n'a is donné de complications chez les malades porteurs et n'a pas provoqué des fections intra-hospitalières, peut être attribué à plusieurs circonstances dont facteur résistance de l'organisme (âge, conditions physiologiques, absence infections virotiques anergisantes), se situe en première ligne. Comme facteurs condaires, on doit prendre en considération: la séparation des malades porurs de staphylocoques, l'administration de l'antibiotique à tous les malades, nsi que l'hospitalisation de courte durée.

CONCLUSIONS

1. Le taux des malades de scarlatine porteurs de staphylocoques pathogènes ans la cavité rhino-pharyngienne, au moment de l'admission à l'hôpital, repréente le degré de la distribution de ces germes dans la population normale étudiée.

2. La résistance de ces souches à la pénicilline, reflète l'utilisation plus moins intense de cet antibiotique, en dehors de l'hôpital. De ce point de ue, les enfants des collectivités fermées, où la pénicilline est fréquemment mployée, présentent des proportions élevées de souches résistantes, en même mps que des réactions de sensibilisation à l'antibiotique.

Il est nécessaire de limiter l'administration de la pénicilline en dehors de hôpital uniquement aux cas à indication formelle clinique ou épidémiologique, fin de prévenir la diffusion des souches résistantes de staphylocoques, ainsi ue l'incidence des réactions de sensibilisation.

3. La sélection des souches résistantes (surtout pour les lysotypes des groupes II et I) s'effectue rapidement, sous le traitement à la pénicilline, tandis que s souches du groupe II sont éliminées.

4. Les staphylocoques pathogènes résistant à la pénicilline, sécrétant de pénicillinase, n'ont exercé aucune influence sur l'évolution clinique de la carlatine. De même ils n'ont pas provoqué d'infections intra-hospitalières, ni nrayé l'action de la pénicilline.

BIBLIOGRAPHIE

1. Baldovin C., Mihalco Fl., Cioroianu N. et Popesco P. — Microbiol., Parazitol. Epidemiol., 1957, **2,** 309.
2. Baldovin-Agapi C., Badenski A. et Mihalco Fl. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1959, **18,** 435
3. Balş M. — The Lancet, 1957, **272,** 195.
4. Bynoe E. T., Elder R. H. et Courtois R. D. — Canad. J. Microbiol., 1956. **2,** 346. (Bull. Inst. Pasteur, 1959, **57,** 549).
5. Colebrook L. — The Lancet, 1956, **270,** 255.
6. Elwood S. — J. Hyg., 1951. **49,** 263.
7. Nestoresco N. et Popovici M. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1957, **16,** 507.
8. Ortel S. — Zbl. Bakt. Orig., I Abt., 1958, **172,** 44. (Bull. Inst. Pasteur, 1959, **57,** 551).
9. Popovici M. et Nestoresco N. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1957, **16,** 269.
10. Roman A. et Hotnog E. — Med. Internă, 1957 No. 4, 555.
11. Rountree Ph. — The Lancet, 1953, **264,** 514.
12. Schmidt B. et Lenk V. — Zbl. Bakt. Orig. I Abt., 1958, **171,** 590. (Bull. Inst. Pasteur, 1959, **57,** 550).
13. Tunevall G. — Acta Path. et Microbiol. Scand., 1955. Suppl. 111, 127.
14. Vogelsang Th. — Acta Path. et Microbiol., Scand., 1953, **33,** 43.
15. Vogelsang Th. — Acta Path. et Microbiol., Scand., 1958. **43,** 196.
16. Wallmark G. — Acta Path. et Microbiol. Scand., 1954. **34,** 57.
17. Williams R. E., Rippon E. J. et Dowsett L. — The Lancet, 1953. **264,** 15.

НАЛИЧИЕ ПАТОГЕННЫХ СТАФИЛОКОККОВ У СКАРЛАТИНОЗНЫХ БОЛЬНЫХ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Среди 600 скарлатинозных больных, обследованных в 1957-ом году, у 18,30% обнаружены патогенные стафилококки в носоглотке при определении в больницу. 40,54% штаммов принадлежали к группе нетипируемой при помощи бактериофага, 25,23% принадлежали к I-ой группе и 17,11% к II-ой и III-ей группе.

В среднем 33,34 % штаммов оказались устойчивыми к пенициллину, из которых ни один не принадлежал к лизотипам II-ой группе и 84,22% принадлежали к третьей группе. Количество устойчивых штаммов стафилококка, обнаруживаемых в носоглотке при определении в больницу, находится в связи с средой, посещаемой детьми; у детей, находящихся в закрытых коллективах, обнаруживаются до 82% устойчивых штаммов. после 3—4 дней лечения пенициллином наблюдается исключение лизотипов II-ой группы и — в то же время — более частое выявление III-ей и I-ой группы.

У 33% больных, у которых были обнаружены стафилококки (1, 37% из общего количества скарлатинозных больных) при выписке из больницы, стафилококки все еще выделялись из носоглотки.

Пенициллиноустойчивые патогенные стафилококки, выделяющие пенициллиназу, не оказали никакое влияние на клиническое течение скарлатины, не вызвали внутрибольничные заражения и не препятствовали действию пенициллина, вводимого больным.

PATHOGENE *STAPHYLOKOKKEN* BEI SCHARLACHKRANKEN

ZUSAMMENFASSUNG

Von 600 Scharlachpatienten, die während des Jahres 1957 untersucht wurden, wiesen 18,30%, im Augenblick der Aufnahme ins Spital, pathogene Staphylokokken in der Nasenrachenhöhle auf. In 40,54% der Fälle waren die Stämme nicht durch Phagen bestimmbar, 25,23% gehörten zur Gruppe I und je 17,11% zu den Gruppen II und III. Durchschnittlich waren 33,34% der Stämme penicillinresistent, mit Schwankungen von null bei den Lysotypen der Gruppe II bis zu 84,22% bei der Gruppe III. Die relative Anzahl resistenter Staphylokokken, die im Augenblick der Spitalsaufnahme bei Trägern angetroffen werden, hängt von der Umwelt ab, in der die Kinder verkehren. So finden sich bei Kindern aus geschlossenen Gemeinschaften bis zu 82% resistente Stämme. Nach 3—4 Tagen Penicillinbehandlung sind die Lysotypen der Gruppe II praktisch ausgeschieden, während die Frequenz der Gruppen III und I zunimmt. Von den Patienten, die ursprünglich Staphylokokken beherbergt hatten, verliessen 33%, d.h. 1,37% aller Scharlachkranken, das Spital als Träger.

Die penicillinresistenten und penicillinase ausscheidenden pathogenen Staphylokokken übten keinerlei Wirkung auf den klinischen Verlauf der Scharlacherkrankung aus. Sie riefen keine Spitalsinfektionen hervor und hinderten die Wirkung des den Kranken verabreichten Penicillins nicht.

PATHOGENIC *STAPHYLOCOCCI* IN SCARLET FEVER PATIENTS

SUMMARY

Out of 600 scarlet fever patients investigated during the year 1957, 18,30% were harbouring pathogenic staphylococci in their nose and throat at the moment of their admission to hospital. The strains were untypable by means of phages in 40,54% of the cases; 25.33% belonged to group I, while groups II and III amounted to 17.11% each. On an average, 33.34% of the strains were penicillin-resistant, variations ranging from zero among the lysotypes of group II to 84.22% in group III. The proportion of resistant staphylococcus strains found upon admittance is related to the environment the children were living in, up to 82% of those living in closed collectivities harbouring resistant strains. After 3—4 days of penicillin treatment the lysotypes belonging to group II are practically eliminated while the incidence rate of groups III and I increases. Thirty-three per cent of the patients harbouring staphylococci on admission, i. e. 1.37% of all the scarlet-fever patients, left hospital still carrying these germs.

Pathogenic penicillin-resistant and penicillinase-secreting staphylococci exerted no influence upon the clinical course of scarlet fever. They did not cause intra-hospital infections and did not interfere with the action of penicillin administered to the patients.

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DU MÉTABOLISME DES AMINO-ACIDES DANS LA TOXINOGÉNÈSE DU BACILLE *CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM*

par

A. Marx

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de Physiologie microbienne)

— Manuscrit reçu le 12 juin 1959 —

Le milieu de culture proposé par Walbum et Reymann (1) est utilisé dans bs laboratoires, en vue de la production de la préparation de la toxine histo-ltique. Les caractéristiques de ce milieu sont: concentration élevée de ptone, présence de viande hachée et absence de glucose. Le fait que la toxi-nèse du bacille *Clostridium histolyticum* exige une quantité importante de ptone indique une interdépendance entre son métabolisme azoté très actif la sécrétion de la toxine. Les nombreux travaux parus les dernières dix années nt prouvé que la toxine histolytique, c'est-à-dire le filtrat de la culture de ce rme, présente une forte activité protéinasique et polypeptidasique (2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10).

Dans le présent ouvrage, nous avons étudié dans quelle mesure l'activité otéolytique, liée à l'élaboration de la toxine, produit des modifications de la mposition des amino-acides libres du milieu de culture que nous employons ns la production. C'est ce qui nous a déterminé à poursuivre la dynamique s amino-acides, de l'azote aminique libre, ainsi que celle de l'ammoniac ndant la toxinogénèse, dans différentes conditions d'incubation.

MÉTHODE ET TECHNIQUE

Nous avons utilisé le milieu préconisé par Walbum et Reymann (W.R) (1), réparé avec du bouillon de veau, additionné de 4% peptone Merck, viande achée bouillie 7,5 gr % et du coton hydrophile 0,4 gr % — pH = 8,0.

La souche employée: *Cl. histolyticum* No. 5, provenant de l'Institut Tara-vitch de Moscou.

La dose limite léthale de la toxine a été établie par inoculation intravei-euse de 0,5 ml de différentes dilutions de toxine, à des souris blanches de 5—18 gr. Le titre a été fixé après 3 jours d'observation, en considérant DLM/50 la dilution qui a provoqué la mort de 50% des souris.

Les épreuves pour les analyses effectuées ont été préparées de la manière uivante:

Quarante huit heures avant l'ensemencement, la souche a été passée sur un ilieu composé de bouillon Pope + glucose 0,5% + gélose 0,4% + gélatine ,1% + viande bouillie. Avant l'ensemencement, le milieu de passage était

régénéré par chauffage, 30 minutes à 100°C. On a ensemencé 1 ml pour 10 ml de milieu.

Après incubation de 48 heures à 37°C, la souche a été passée sur le milieu de culture Walbum-Reymann (préalablement régénéré comme il a été indiqué plus haut), utilisant 20 ml inoculum pour 2000 ml de milieu. La toxinogénèse a été poursuivie à 37°C et à la température de la chambre.

Les épreuves de toxine, prélevées après 6, 8, 10, 14, 27 heures d'incubation, étaient centrifugées et gardées ensuite à 4°C, sous chloroforme, jusqu'à la fin de l'expérience.

Les amino-acides ont été poursuivis par la méthode de la chromatographie sur papier (Whatman No. 1). Nous avons employé dans ce but les liquides d'irrigation: butanol — acide acétique — eau (4: 1: 5) et phénol-eau (1: 1), effectuant cinq irrigations consécutives pour chaque détermination. Le développement a été fait avec une solution de ninhydrine 0,2% dans du chloroforme (avec 0,1 ml% colidine). Pour l'identification de l'arginine, nous avons employé la réaction avec de l'oxyne (10) et pour l'hystidine, le test Pauly (11).

L'azote ammoniacal a été déterminé par la méthode micro-Kjeldahl. Les déterminations d'azote aminique ont été effectuées à l'aide de la méthode Pope-Stevens. Les valeurs du pH ont été établies par la méthode électrométrique.

RÉSULTATS:

La variation des amino-acides libres du milieu a été poursuivie au cours de la toxinogénèse, sur de nombreux lots, dans différentes conditions expérimentales. La toxinogénèse à 37°C a déterminé dans le milieu W. R., par rapport au témoin non-ensemencé, les modifications suivantes: la cystine-cystéine, absente du milieu non-ensemencé, apparaît après quelques heures d'incubation du germe et augmente progressivement. La lysine s'intensifie graduellement, l'hystidine se maintenant non-modifiée. L'arginine disparaît après 8—10 heures d'incubation. L'acide aspartique reste constant. La sérine et le glycocolle disparaissent après 10 heures, l'acide glutamique après 8 et la thréonine après 14 heures. L'alanine augmente progressivement pendant la toxinogénèse. La proline, absente du milieu non-ensemencé, apparaît après 6—8 heures. La tyrosine et le phényl-alanine s'intensifient légèrement et graduellement. Le tryptophane et la méthionine restent invariables. La valine et la leucine s'intensifient graduellement.

En ajoutant au milieu de culture 5% de glucose, aucune différence visible n'a été signalée.

L'incubation effectuée à la température de la chambre a retardé l'élaboration de la toxine, le titre optime étant obtenu seulement après 80 heures, tandis que par l'incubation à 37° C, le titre optime est atteint au bout de 14 heures. Parallèlement au retard de la toxinogénèse, la dynamique des amino-acides du milieu a subi les modifications suivantes: le glycocolle disparaît après 60 heures, l'acide glutamique après 32, la thréonine après 80, alors que la proline apparaît après 32 heures.

En ce qui concerne l'azote-aminique libre du milieu, nous constatons, au cours de la toxinogénèse, une augmentation de 18% pendant les 10—14 heures d'incubation (de 240 à 280 mg%), suivie d'une légère diminution. La présence du glucose 5% a déterminé des modifications peu importantes du point de vue des valeurs de l'azote aminique libre.

La quantité d'azote ammoniacal augmente considérablement pendant la oxinogénèse (de 52 à 177 mg %). En milieu glucosé, la production de l'azote mmoniacal est de 10% inférieure à celle donnée par les milieux non-glucosés, on augmentation progressive étant toutefois évidente.

Le pH du milieu diminue pendant l'incubation, cette diminution étant plus vidente pour les épreuves glucosés.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Au cours de la toxinogénèse du bacille *Cl. histolyticum* sur milieu Walbum-eymann, nous avons suivi la dynamique des amino-acides libres du milieu, arallèlement aux déterminations du titre de la toxine. Nous avons constaté ue certains amino-acides (cystine-cystéine, proline), absents du milieu non-nsemencé, apparaissent pendant la toxinogénèse; d'autres — lorsqu'ils sont résents — s'accumulent (lysine, alanine, tyrosine, phényl-alanine, valine, leucine), une autre catégorie d'amino-acides disparaît du filtrat de culture (arginine, rine, glycocolle, acide glutamique et thréonine). Il y a en plus, un quatrième roupe, qui ne subit pas de modifications (histidine, acide aspartique, tryptophane, néthionine). La sécrétion optime de toxine une fois atteinte, les modifications ualitatives signalées ne se produisent plus. Par exemple, poursuivant la dis-arition de la thréonine — dernier amino-acide consommé — nous avons onstaté que ce phénomène se produit après 14 heures, en cas d'incubation 37°C et après 80 heures, lorsque l'incubation a lieu à la température de chambre.

La présence dans le milieu de glucose en quantité élevée (5%) ne détermine ucune modification visible, ni dans le contenu des amino-acides libres, ni du tre de la toxine. L'acidification du milieu, déterminée par la fermentation du ucre, fait diminuer de manière évidente l'activité desaminasique, mise en évi-ence par les valeurs inférieures, que présente l'azote ammoniacal de toutes es épreuves glucosées. Ces résultats confirment les travaux de HIRANO et HONDA 13), selon lesquels la présence du glucose n'influencerait pas la consommation e la peptone, mais inhiberait la production d'ammoniac.

L'ensemble de nos recherches montre que le phénomène de la toxino-énèse du bacille histolyticum est accompagné de modifications importantes ans la constitution amino-acidique du milieu de culture. Le fait que la dyna-nique de ces modifications se trouve en étroite liaison avec la sécrétion de la oxine, prouve que certains amino-acides sont impliqués directement dans la haîne métabolique qui conduit finalement, à la production de la toxine*).

BIBLIOGRAPHIE

1. WALBUM L. E. et REYMANN G. C. — J. Bact. a Path. 1938, **46,** 315.
2. WEIL L. et KOCHOLATY W. — Biochem. J. 1937, **31,** 1255.
3. BLANC I. et PAZERSKI E. — C. R. Soc. Biol. 1920, **83,** 1343.
4. KOCHOLATY W., SMITH L. et WEIL L. — Biochem. J. 1938, **32,** 1691.
5. HEYNINGEN W. E. — Biochem. J. 1940, **34,** 1540.
6. DOȚENCO P. S. — Inst. Epidem. Microbiol. Irkuțk 1948, 4, 169.
7. OGLE J. D. et TYTELL A. A. — Arch. Biochem. a Biophys. 1953, **42,** 327.

*) La préparation des toxines employées dans nos travaux, ainsi que les déterminations es DLM, ont été effectuées dans le Laboratoire des Sérums anti-gangréneux du Service naérobies. Nous tenons à leur exprimer nos remerciements.

8 Monier R. et collab. — Biochem. Biophys. Acta, 1953, **18**, 71.
9. De Bellis et collab. — Nature 1954, **174**, 1191.
10. Mandl I., Ferguson L. T. et Zaffute S. F. — Arch. Biochem. a Biophys. 1957, **69**, 565.
11. Ceriotti G. et Spandrio L. — Biochem. J. 1957, **66**, 603.
12. Jorpes E. — Biochem. J. 1932, **26**, 1507.
13. Hirano S. et Honda O. — Igaku to Seibuttsugaku 1952, **24**, 192.

К ИЗУЧЕНИЮ ОБМЕНА АМИНОКИСЛОТ ПРИ ТОКСИНООБРАЗОВАНИИ *CL. HISTOLYTICUM*

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В процессе токсинообразовании *Cl. histolyticum* на среде Вальбум-Реимана, изучалась динамика свободных аминокислот в питательной среде, параллельно с определениями титра токсина. Установлено, что некоторые аминокслоты, отсутствующие в незасеяной среде, появляются в течении токсинообразования, или (при наличии с начала) накопляются в среде, в то время как другие аминокислоты исчезают из фильтрата культуры.

Четверетая группа аминокислот остается практически неизмененной. Установлена тесная связь между качественными изменениями аминокислот и оптимальным выделением токсина в питательную среду.

BEITRÄGE ZUM STUDIUM DES AMINOSÄURENSTOFFWECHSELS WÄHREND DER TOXINBILDUNG DURCH *CL. HISTOLYTICUM*.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Verlauf der Toxinbildung bei *Cl. histolyticum* in Walbum-Reymann Nährboden, wurde die Dynamik der freien Aminosäuren im Nährmilieu, gleichzeitig mit Toxintiterbestimmungen verfolgt. Es wurde festgestellt, dass gewisse Aminosäuren, die im ursprünglichen Nährboden nicht vorhanden sind, im Verlauf der Toxigenese auftreten, beziehungsweise, insofern sie vorhanden sind, angereichert werden, während eine andere Kategorie aus den Kulturfiltraten verschwindet. Eine vierte Gruppe von Aminosäuren bleibt praktisch unverändert. Zwischen den qualitativen Änderungen der Aminosäuren und der optimalen Toxinausscheidung in die Nährflüssigkeit wurde ein enger Zusammenhang festgestellt.

CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF AMINO-ACID METABOLISM IN TOXIN PRODUCTION BY *CL. HISTOLYTICUM*.

SUMMARY

The dynamics of free amino-acids were investigated during toxin formation by *Cl. histolyticum* in Walbum-Reymann's culture medium. Toxin titres were determined at the same time.

Certain amino-acids which are absent in the sterile culture medium were found to appear during toxin formation and the amount of others which are present from the beginning, to increase, while another category disappears from the culture filtrate. A fourth group of amino-acids remains practically unchanged. A close relationship was found to exist between qualitative changes in the amino-acids and optimal toxin formation in the culture medium.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES CONCERNANT LA MÉTHODE MIXTE (ORALE — SOUS-CUTANÉE) DE LA VACCINATION ANTI-TYPHOÏDIQUE.

par

I. R. Vlădoianu, V. V. Russu, Ligia Naş et F. Strejnico

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Section des Entérobactériacées)

— Manuscrit reçu le 7 juillet 1959 —

Au cours des dernières années, on a étudié, dans deux districts du pays, la méthode mixte ou combinée de vaccination anti-typhoïdique.

Le principe de cette méthode est basé sur l'association des voies d'administration, orale et sous-cutanée, du vaccin T.A.B., en vue d'obtenir les avantages réunis, offerts par les deux voies.

La décision d'introduire dans la pratique le procédé mixte de la vaccination anti-typhoïdique a été prise, à la suite des résultats favorables, obtenus par D. Combiesco et coll. (2) dans une étude expérimentale, effectuée sur des souris blanches, immunisées contre l'infection avec *S. typhi murium*. Cette étude, ainsi que les résultats encourageants de l'application de la vaccination mixte T.A.B. (11, 12), nous ont déterminé d'entreprendre une série de recherches expérimentales supplémentaires, dans le but d'une éventuelle amélioration de ce procédé d'immunisation active anti-typhoïdique.

Dans la première étape de nos expériences, nous avons tâché, de contrôler d'une part, la valeur de chacun des deux éléments associés, constituant la méthode mixte dans l'établissement de l'immunité active (vaccination orale et inoculation sous-cutanée) et d'autre part, le rôle qui revient à la concentration de germes dans les doses orales de vaccin, pour la détermination de l'immunité.

Nous avons ensuite essayé d'établir, par des recherches comparatives, une éventuelle relation entre l'efficience de la méthode mixte et la durée des intervalles qui séparent les doses orales, utilisées dans le schéma de cette méthode de vaccination.

Quelques unes de ces expériences ont été effectuées seulement sur des animaux de laboratoire et d'autres, tant sur les animaux d'expérience, que sur l'homme.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — Comme animal de laboratoire, nous avons employé la souris beige, appartenant à la lignée DBAO, souche qui, dans nos conditions de travail, s'est montrée très résistante aux contaminations naturelles de Salmonella, nous faisant entrevoir la possibilité d'éviter l'inconvénient que représentent les porteurs de germes parmi les animaux d'expérience.

Afin de pouvoir tirer des conclusions valables pour la vaccination T.A.B. de l'homme, nous avons choisi comme modèle expérimental, dans les recherches

sur la souris, l'infection avec *S. typhi murium*, dont l'aspect correspond à celui de l'infection typhoïdique chez l'homme.

Pour la préparation du vaccin anti-typhi murium, ainsi que pour le déclanchement de l'infection chez les animaux immunisés, nous avons utilisé la souche *S. typhi murium 779c*, isolée des selles de malades atteints d'une toxi-infection alimentaire. Nous avons choisi cette souche pour sa virulence marquée (DL_{50} = approximativement 200 germes; voie intra-péritonéale).

L'immunisation des souris a été effectuée à l'aide d'une suspension en solution saline 0,85% de germes tués par chauffage. Dans ce but, nous avons préparé des cultures sur gélose en boîtes Roux, incubées 20 heures à 37°. La suspension obtenue dans environ 10 ml solution saline 0,85% pour chaque boîte Roux, a été inactivée par chauffage — 2 heures à 59° — et ensuite contrôlée du point de vue stérilité et pureté. La suspension épaisse obtenue a représenté le point de départ pour la préparation des suspensions finales, destinées à la vaccination des animaux. Ainsi, nous avons préparé des suspensions concentrées, alcoolées 20%, contenant 10 ou 38 milliards de germes/ml, pour l'administration orale et une faible suspension de 200 millions germes/ml, pour les inoculations souscutanées.

Indépendamment de la voie d'administration, chaque souris a reçu 0,5 ml des suspensions respectives. Afin d'assurer une distribution égale des doses orales, ces dernières n'ont pas été ajoutées aux aliments, mais introduites directement dans l'estomac, à l'aide d'une sonde.

Vu que la lignée des souris DBAO, se montre réfractaire à l'infection par voie orale avec *S. typhi murium*, présentant, en échange, une grande sensibilité à l'administration des germes par voie intrapéritonéale (fait prouvé par nous, expérimentalement), nous avons choisi cette dernière voie pour le déclanchement de l'infection chez la souris.

B. — Dans les expériences sur l'homme, nous avons utilisé le vaccin T.A.B., préparé à l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » et comme test de l'effet de la vaccination, le titrage des anticorps agglutinants.

Le titrage des agglutinines de type « H » (flagellaire) et « O » (somatique) a été exécuté d'après la technique standard, les dilutions étant comprises entre 1/25—1/1000. Comme antigène, on a employé les suspensions « H » et « O », préparées à l'Institut « Dr. I. Cantacuzino ». Incubation au bain-marie à 52° 2 heures pour les agglutinines « H » et 20 heures pour les agglutinines « O ».

Le titrage des agglutinines Vi a été effectué à l'aide d'un antigène vivant, préparé avec la souche *S. typhi Vi Bhatnagar* (suspension en solution saline 0,85%, contrôlée avec les sérums anti O et Vi). Les sérums à tester, inactivés, ont été dilués 1/5—1/180, dans un volume de 0,5 ml, auquel a été ajouté un volume égal d'antigène en concentration de 500 millions germes/ml.

RÉSULTATS

Nous donnons le protocole des expériences effectuées et les résultats obtenus:

Expérience I. Appliquant à la souris le schéma de la vaccination mixte, utilisé dans nos recherches antérieures sur l'homme (11,12)*), nous avons tâché

*) trois doses orales, par 10 ml vaccin T.A.B. corpusculaire, en concentration de 10 milliards germes/ml (alcoolé 20%), administrées à des intervalles de 48 heures + 1 dose souscutanée de 0,5 ml vaccin, en concentration habituelle, à un intervalle de 20 jours après la dernière dose orale.

l'apprécier la contribution de chacun des éléments de cette méthode (voie orale et voie sous-cutanée). Dans cette expérience, nous avons également étudié le rôle de la concentration des germes des doses orales, prévues dans le schéma de la vaccination mixte, appliquée par nous.

Nous avons utilisé des souris de 14—16 gr, réparties en 4 lots.

— Les 27 animaux du premier lot ont reçu, à des intervalles de 48 heures, trois doses orales de vaccin concentré, alcoolé 20%, contenant 38 milliards germes/ml.

— Les 32 animaux du second lot ont été immunisés d'après la même méthode, sauf que la concentration du vaccin était plus petite (10 milliards germes/ml).

— Les 36 souris du 3-e lot, ont reçu chacune 0,5 ml (voie sous-cutanée) de suspension de vaccin de 200 millions germes/ml.

Enfin, le 4-e lot de 36 souris normales, a servi comme témoin.

Les animaux ont été infectés par voie intrapéritonéale, de manière à ce que l'infection survienne simultanément chez tous les groupes, respectivement 30 jours après la dernière administration de vaccin. Chaque souris a reçu, par voie intrapéritonéale, 200.000 germes vivants, suspendus en 0,5 ml solution Ringer (souche *S. typhi murium* 779$_c$).

Poursuivant les animaux durant 20 jours, et notant ceux qui mouraient*) pendant cet intervalle, nous avons obtenu les résultats consignés dans le tableau I.

Tableau I

Efficience des éléments du schéma de vaccination mixte. (expérience I)

Lots comparés	Nombre animaux inoculés	Nombre animaux morts	Nombre animaux survivants	% survies	Valeur χ^2	Degrés de liberté	Probabilité d'erreur	Caractère de la différence
Lot 1 Lot 4	27 36	7 36	20 0	74 0	39,06	1	$< 0,05$	Significatif
Lot 2 Lot 4	32 36	9 36	23 0	72 0	39,10	1	$< 0,05$	Significatif
Lot 3 Lot 4	36 36	10 36	26 0	72 0	40,69	1	$< 0,05$	Significatif
Lot 1 Lot 2	27 32	7 9	20 23	74 72	0,15	1	$> 0,10$	Non-significatif
Lot 1 Lot 3	27 36	7 10	20 26	74 72	0,10	1	$> 0,10$	Non-significatif
Lot 2 Lot 3	32 36	9 10	23 26	72 72	0,00	1	$> 0,10$	Non-significatif

Il résulte du tableau I, que la vaccination orale par 3 doses de vaccin concentré, administrées à des intervalles de 48 heures (lot 1 et 2), aussi

*) On a isolé du sang récolté du coeur des souris mortes, S. typhi murium.

bien que la vaccination sous-cutanée, par inoculation unique (lot 3), ont été capables de conférer aux animaux, une immunité appréciable et de valeur sensiblement égale.

Il ressort du même tableau, que — dans nos conditions de travail — une forte concentration des germes du vaccin utilisé pour l'administration orale, n'a pas donné une augmentation significative du pouvoir immunisant.

Expérience II. Dans cette expérience, effectuée également sur la souris, nous avons étudié l'efficience de la vaccination mixte, d'après le schéma habituel, en comparaison avec l'efficacité d'un schéma similaire dont les intervalles entre les doses orales ont été prolongés de 48 heures, à 7 jours.

On a utilisé trois lots de 30 souris chacun (poids = 20—22 gr).

Les animaux du premier lot, ont été immunisés d'après le schéma suivant: trois doses orales (vaccin 38 milliards germes/ml), à 48 heures d'intervalle + 1 dose sous-cutanée, 20 jours après la dernière dose orale.

Les souris du 2-e lot, ont été immunisées par le même procédé, sauf que les doses orales étaient administrées à des intervalles de 7 jours, au lieu de 48 heures.

Le 3-e lot, servant comme témoin, n'a pas été immunisé.

Un mois après la vaccination sous-cutanée, les trois groupes d'animaux ont été soumis à l'épreuve de l'immunité. L'infection et le contrôle des animaux ont été pareils à ceux de la première expérience. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau II.

Tableau II

Efficience de la vaccination mixte à intervalles de 48 heures et respectivement 7 jours entre les doses orales. (expérience II)

Lots comparés	Nombre animaux inoculés	Nombre animaux survivants	% survies
Lot 1	30	30	100
Lot 2	30	30	100
Lot 3	30	0	0

Du tableau II se détache nettement l'effet protecteur conféré aux souris, par la vaccination mixte. En effet, les animaux vaccinés d'après cette méthode, ont survécu 100%, contrairement aux témoins, qui sont tous morts.

On constate également, que les deux schémas d'immunisation ont donné des résultats tout aussi satisfaisants, malgré les intervalles entre les doses orales, qui, pour un groupe ont été de 48 heures et pour l'autre de 7 jours.

Expérience III. Le but de cette expérience, effectuée sur l'homme, est similaire à celui de l'expérience précédente.

Nous avons soumis à la vaccination T.A.B. deux groupes d'approximativement 50 personnes chacun, qui n'avaient pas subi antérieurement la vaccination T.A.B.

Le premier groupe — groupe A — a été soumis à la vaccination habituelle, c'est-à-dire: association de 3 doses orales — de 10 ml chacune — de vaccin

oncentré *), administrées à des intervalles de 48 heures, avec une dose sous-utanée de 0,5 ml vaccin de concentration normale **), 20 jours après la dernière ose orale.

Les personnes de l'autre groupe — groupe B — ont subi, comme dans expérience précédente, une vaccination similaire, avec la seule différence que es intervalles de l'administration orale, ont été prolongés de 48 heures à 7 jours.

Pour les épreuves du sérum sanguin, prélevées des sujets des deux roupes, on a étudié les anticorps agglutinants TH, BH, TO, BO et Vi, avant la accination, 20 jours après l'administration des doses orales (avant l'inoculation ous-cutanée) et un mois après la vaccination complète.

L'évolution de ces anticorps est présentée dans le tableau III, qui indique our chaque catégorie des anticorps étudiés, le pourcentage des sérums négatifs t positifs, ainsi que la distribution du pourcentage des titres rencontrés à l'occasion les trois prélèvements de sang. On a considéré négatifs les sérums dépourvus l'anticorps dans les plus petites dilutions testées (1/25 pour les agglutinines H ou 0 et 1/10 pour les agglutinines Vi).

Le tableau IV résume l'étude comparative de la capacité agglutinogène, léterminée par les deux schémas de vaccination mixte T.A.B.

Il ressort des tableaux III et IV, que les deux schémas de vaccination mixte nti-typhoïdique, utilisés dans cette expérience, sont capables de déclencher 'élaboration d'anticorps sériques. Tandis que la formation des agglutinines TH et Vi paraissait être favorisée, surtout par le schéma à intervalles de 48 ieures entre les administrations orales, en ce qui concerne l'élaboration des agglu-inines TO, un effet plus marqué reviendrait toutefois au second schéma de accination mixte.

De même, si on compare la fréquence des agglutinines, avant la vaccination t à l'occasion de la seconde saignée, on constate généralement, une certaine upériorité de la vaccination orale, par doses administrées à des intervalles de 48 heures.

DISCUSSION

On a rappelé au début du présent travail, que le schéma de vaccination nti-typhoïdique, utilisé dans nos essais antérieurs, sur l'homme (11, 12), a été ecommandé par D. Combiesco et coll. (2). De l'étude de ces auteurs, sur 'immunisation de la souris avec S. typhi murium, par différentes voies, il ressort que la méthode mixte donne des résultats supérieurs à ceux obtenus avec la accination sous-cutanée, par trois inoculations, à 10 jours d'intervalle. Le même ravail souligne l'importance de l'ordre de succession des voies d'administration dans la vaccination mixte, prouvant que la vaccination qui débute par l'inocu-ation sous-cutanée et continue par l'administration orale du vaccin, est moins efficace. En plus, on constate une efficience plus marquée lorsque la dose sous-cutanée est administrée plus de 15 jours après les doses orales.

Nos expériences, effectuées cette fois-ci, non sur des souris blanches, mais sur des souris beiges, appartenant à la lignée Dbao, confirment les résultats favorables obtenus par les auteurs cités.

*) Vaccin T.A.B. corpusculaire, contenant 10 milliards germes/ml (4/6 T., 1/6 A., 1/6 B., alcoolé 20%).

**) Vaccin T.A.B. corpusculaire, contenant 1,5 milliards germes/ml (4/6 T., 1/6 A, 1/6 B, phénolé 0,5%).

Tableau III

Evolution des anticorps agglutinants « TH » « BH », « TO », « BO » et « Vi », au cours de l'immunisation par la méthode de vaccination T.A.B. mixte, avec intervalles de 48 heures et respectivement 7 jours entre les doses orales (expérience III).

Anticorps	Saignée	Lot	Sérums négatifs		Sérums positifs		Distribution du pourcentage des titres 1/25		1/50		1/100		1/250		1/500		1/1000		Total sérums	
			No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Agglutinines « TH »	I	A	32	66,7	16	33,3	10	20,8	4	8,3	1	2,1	1	2,1	—	—	—	—	48	100
		B	36	83,8	7	16,2	4	9,3	1	2,3	1	2,3	—	—	1	2,3	—	—	43	100
	II	A	15	40,6	22	59,4	10	27,0	6	16,2	4	10,8	1	2,7	-	—	1	2,7	37	100
		B	26	72,2	10	27,8	6	16,7	3	8,3	—	—	—	—	—	—	1	2,8	36	100
	III	A	3	10,0	27	90,0	6	20,0	4	13,3	10	33,4	4	13,3	2	6,7	1	3,3	30	100
		B	11	36,7	19	63,3	6	20,0	5	16,7	4	13,3	3	10,0	—	—	1	3,3	30	100
Agglutinines « TO »	I	A	14	29,2	34	70,8	14	29,2	13	27,1	4	8,3	1	2,1	2	4,1	—	—	48	100
		B	21	47,7	23	52,3	14	31,8	6	13,6	1	2,3	1	2,3	1	2,5	—	—	44	100
	II	A	5	12,8	34	87,2	9	23,1	3	7,7	16	41,0	5	12,8	1	2,6	—	—	39	100
		B	11	30,6	25	69,4	9	25,0	10	27,7	4	11,1	1	2,8	1	2,8	—	—	36	100
	III	A	2	6,7	28	93,3	4	13,3	9	30,0	8	26,7	5	16,6	2	6,7	—	—	30	100
		B	5	16,7	25	83,3	9	30,0	9	30,0	3	10,0	2	6,6	2	6,7	—	—	30	100
Agglutinines « BH »	I	A	35	72,9	13	27,1	7	14,5	2	4,2	2	4,2	1	2,1	1	2,1	—	—	48	100
		B	34	79,1	9	20,9	4	9,3	2	4,6	3	7,0	—	—	—	—	—	—	43	100
	II	A	18	50,0	18	50,0	9	25,0	4	11,1	2	5,6	3	8,3	—	—	—	—	36	100
		B	24	66,7	12	33,3	3	8,3	6	16,6	2	5,5	1	2,8		—	—	—	36	100
	III	A	10	33,3	20	66,7	4	13,3	3	10,0	7	23,4	6	20,0	—	—	—	—	30	100
		B	9	31,1	20	68,9	7	24,1	4	13,8	5	17,2	3	10,3	1	3,5	—	—	29	100
Agglutinines « BO »	I	A	44	91,7	4	8,3	3	6,2	1	2,1	—	—	—	—	—	—	—	—	48	100
		B	42	97,7	1	2,3	1	2,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	43	100
	II	A	30	77,0	9	23,0	7	18,0	1	2,5	1	2,5	—	—	—	—	—	—	39	100
		B	25	71,4	10	28,6	6	17,2	4	11,4	—	—	—	—	—	—	—	—	35	100
	III	A	23	76,7	7	23,3	6	20,0	—	—	1	3,3	—	—	—	—	—	—	30	100
		B	24	80,0	6	20,0	5	16,7	1	3,3	—	—	—	—		—	—	—	30	100
							1/10		1/20		1/40		1/80		1/160		1/320			
Agglutinines « Vi »	I	A	44	91,7	4	8,3	2	4,1	1	2,1	1	2,1	—	—	—	—	—	—	48	100
		B	41	93,2	3	6,8	—	—	3	6,8	—	—	—	—	—	—	—	—	44	100
	II	A	32	84,2	6	15,8	5	13,2	1	2,6	—	—	—	—	—	—	—	—	38	100
		B	32	88,9	4	11,1	1	2,8	1	2,8	2	5,6	—	—	—	—	—	—	36	100
	III	A	21	72,4	8	27,6	3	10,4	4	13,8	—	—	1	3,4	—	—	—	—	29	100
		B	28	93,3	2	6,7	—	—	2	6,7	—	—	—	—		—	—	—	30	100

Légende: I = saignée avant la vaccination;
II = saignée 20 jours après les doses orales, avant l'inoculation sous-cutanée;
III = saignée un mois après l'inoculation sous-cutanée;

Tableau IV

Étude comparative de la capacité agglutinogène déterminée par la vaccination T.A.B. mixte, à intervalles de 48 heures et respectivement 7 jours entre les doses orales (expérience III).

Anticorps	Lots comparés	Saignée	Nombre total sérums	Nombre sérums négatifs	Nombre sérums positifs	% sérums positifs	Valeur χ^2	Degrés de liberté	Probabilité d'erreur	Caractère de la différence
Agglutinines « H »	Lot A	I	48	32	16	33	5,76	1	<0,05	Significatif
	Lot A	II	37	15	22	59				
	Lot A	I	48	32	16	33	23,96	1	<0,05	Significatif
	Lot A	III	30	3	27	90				
	Lot B	I	43	36	7	16	1,53	1	>0,10	Non significatif
	Lot B	II	36	26	10	28				
	Lot B	I	43	36	7	16	17,06	1	<0,05	Significatif
	Lot B	III	30	11	19	67				
	Lot A	I	48	32	16	33	3,68	1	<0,10 >0,05	Presque significatif
	Lot B	I	43	36	7	16				
	Lot A	II	37	15	22	59	7,43	1	<0,05	Significatif
	Lot B	II	36	26	10	28				
	Lot A	III	30	3	27	90	5,96	1	<0,05	Significatif
	Lot B	III	30	11	19	67				
Agglutinines « TO »	Lot A	I	48	14	34	71	3,36	1	<0,10 >0,05	Presque significatif
	Lot A	II	39	5	34	87				
	Lot A	I	48	14	34	71	5,73	1	<0,05	Significatif
	Lot A	III	30	2	28	93				
	Lot B	I	44	21	23	52	2,43	1	>0,10	Non significatif
	Lot B	II	36	11	25	69				
	Lot B	I	44	21	23	52	7,55	1	<0,05	Significatif
	Lot B	III	30	5	25	83				
	Lot A	I	48	14	34	71	3,35	1	<0,10 >0,05	Presque significatif
	Lot B	I	44	21	23	52				
	Lot A	II	39	5	34	87	3,49	1	<0,10 >0,05	Presque significatif
	Lot B	II	36	11	25	69				
	Lot A	III	30	2	28	93	1,45	1	>0,10	Non significatif
	Lot B	III	30	5	25	83				
Agglutinines « VI »	Lot A	I	48	44	4	8	1,14	1	>0,10	Non significatif
	Lot A	II	38	32	6	16				
	Lot A	I	48	44	4	8	5,08	1	<0,05	Significatif
	Lot A	III	29	21	8	27				
	Lot B	I	44	41	3	7	0,45	1	>0,10	Non significatif
	Lot B	II	36	32	4	11				
	Lot B	I	44	41	3	7	0,00	1	>0,10	Non significatif
	Lot B	III	30	28	2	7				
	Lot A	I	48	44	4	8	0,07	1	>0,10	Non significatif
	Lot B	I	44	41	3	7				
	Lot A	II	38	32	6	16	0,26	1	>0,10	Non significatif
	Lot B	II	36	32	4	11				
	Lot A	III	29	21	8	27	4,58	1	<0,05	Significatif
	Lot B	III	30	28	2	7				

Légende : I = saignée avant la vaccination;
II = saignée, 20 jours après les doses orales, avant l'inoculation sous-cutanée;
III = saignée, un mois apres l'inoculation sous-cutanée.

Contrairement à l'étude sus-mentionnée, selon laquelle la vaccination par ɔie orale n'aurait pas donné de résultats satisfaisants, nos expériences montrent ue la méthode orale est capable de conférer, à elle seule, une protection appré- able (expérience I), fait qui met en évidence la valeur de ce procédé d'immuni- tion active anti-typhoïdique.

Dans la méthode mixte, l'efficience de la vaccination orale s'associe à celle e l'inoculation sous-cutanée. Cette association respecte la « loi des intervalles » ans l'immunisation; paraissant très valeureuse, elle réussit à conférer un degré ıpérieur de protection contre l'infection. (expérience II).

Zdrodovski (13) a spécialement attiré l'attention sur le rôle des intervalles ans l'immunisation — « loi des intervalles ». D'après cet auteur, l'efficacité ɔmunisante de chaque inoculation répétée est déterminée par la durée optime es intervalles séparant l'excitation respective de l'excitation précédente. La remière inoculation immunisante produit une modification de la structure ssulaire, suivie par le changement de la réactivité de l'organisme vis-à-vis e l'antigène. Les excitations immunisantes ultérieures, répétées à de grands tervalles, conservent ou augmentent même la réactivité immunologique de ɔrganisme. Au contraire, les excitations répétées à de courts intervalles, épuisent capacité de réaction de l'organisme, qu'elles déprime. Il en résulte l'impor- nce de l'intervalle optime nécessaire au rétablissement des tissus « modifiés », ar l'excitation antérieure.

La « loi des intervalles », ainsi présentée par Zdrodovski, se trouve entiè- ment confirmée dans l'immunisation anti-typhoïdique par voie sous-cutanée.

En effet, la plupart des études expérimentales sur l'activité immunologique e l'organisme, au cours des vaccinations anti-typhoïdiques, par administration ous-cutanée du vaccin T.A.B., soulignent l'importance des intervalles entre s inoculations.

Dans un ouvrage récent, O. A. Gukovskaia (4) montre que l'espacement es intervalles entre les inoculations sous-cutanées de vaccin anti-typho-para- phoïdique augmente l'efficacité de l'immunisation.

Qu'advient-il cependant, lorsque l'action immunisante initiale consiste en ɔses orales (entérales) répétées, suivies, après un intervalle approprié, par une oculation sous-cutanée? La durée de l'intervalle entre les doses orales jouerait- le un rôle, dans ce cas?

Conformément à la loi des intervalles, les trois doses orales du schéma de la ıccination mixte, peuvent être considérées comme une excitation primaire, noculation sous-cutanée représentant l'excitation complémentaire tardive. elon nos recherches, l'immunisation primaire est assez intense pour déterminer modification préparante de l'organisme. L'intervalle entre l'immunisation imaire (doses orales) et l'excitation complémentaire tardive (inoculation sous- ıtanée), permettant la modification préparante complète, il va de soi que effet de la revaccination (inoculation sous-cutanée) sera positif. Enfin, le fait ue l'inoculation sous-cutanée soit capable de conférer, à elle seule, une résis- ance presque égale à celle de l'immunisation primaire (expérience I), nous xplique l'effet maximum déterminé par la vaccination mixte, d'après le héma utilisé.

De l'expérience II, il ressort que, dans nos conditions de travail, pour la ɔse infectante utilisée (200.000 germes), le schéma de vaccination mixte, à ourts intervalles (48 heures) entre les doses orales, n'a pas conféré un degré protection inférieur à celui du schéma similaire, à intervalles plus longs

(7 jours) entre les doses orales. Obtenant un effet protecteur maximum, par les deux procédés, il est difficile d'établir lequel des deux a été plus efficace. Employant une plus forte dose infectante, on serait peut-être parvenu à faire une distinction dans le comportement des deux groupes d'animaux vaccinés.

Les résultats de la III-e expérience montrent toutefois, que l'élaboration d'anticorps sériques n'a pas été plus marquée chez les personnes vaccinées par doses orales, à de longs intervalles (7 jours), comme il aurait été à prévoir. Cette observation est difficile à expliquer. Une hypothèse serait permise, selon laquelle l'administration du vaccin par voie orale, à de courts intervalles (24 —48 heures), donnant lieu à une absorption plus intense des antigènes administrés, éviterait l'installation d'une barrière au niveau de l'intestin, au cours des intervalles prolongés entre les doses orales.

Il est certain que les anticorps agglutinants ne reflètent pas le pouvoir protecteur des sérums testés. On sait néanmoins, que pour certains de ces anticorps — en premier lieu les agglutinines Vi, et dans une plus petite mesure, les agglutinines O —, on peut établir une relation avec le pouvoir protecteur. De ce point de vue, le fait que le schéma de vaccination mixte, à intervalles de 48 heures entre les doses orales, ait été capable de déterminer une élaboration significative d'agglutinines Vi, contrairement à celui à intervalles de 7 jours, plaide en faveur du premier schéma.

Des résultats de l'expérience III se détache en plus, la constatation que la vaccination par voie orale, est capable de déclencher la formation d'anticorps sériques. Les recherches d'autres expérimentateurs ont abouti aux mêmes conclusions (1, 5, 7, 8, 9, 10), malgré que cette opinion ne soit point partagée par tous les auteurs (3, 14).

La concentration des doses orales de vaccin paraissent jouer un rôle mineur, lorsque leur densité en germes dépasse un certain degré (expérience I). Dans nos conditions de travail, sur les souris, le minimum de doses orales utilisées a été de 5 milliards germes/dose, ou un total de 15 milliards germes pour les trois doses. Cette quantité d'antigène peut être considérée comme « dose active maximum », étant donné que l'utilisation d'une quantité plus élevée n'a pas été suivie par une plus forte capacité immunisante.

Nous rapportant aux doses orales administrées à l'homme (expérience III), nous constatons un nombre total de 300 milliards germes (4/6 S. typhi, 1/6 S. paratyphi A et 1/6 S. paratyphi B), ce qui constitue une quantité considérable d'antigène, capable d'assurer le rôle de: « dose active maximum ».

De nouvelles expériences s'imposent, afin de vérifier les résultats du présent travail.

Il est intéressant de noter le comportement des souris appartenant à la lignée DBAO vis-à-vis de l'infection avec S. typhi murium. Ainsi qu'il résulte de nos essais, cette lignée se montre très résistante à l'infection par voie orale, même en fortes doses (5 milliards germes). En échange, il a suffi du nombre restreint de 100 germes, administrés par voie intrapéritonéale, pour provoquer l'infection mortelle typique.

La résistance à l'infection par voie orale, n'a cependant pas empêché une immunisation efficace des animaux, lorsqu'ils étaient vaccinés par cette voie (expériences I et II). La protection conférée a été testée par le déclanchement ultérieur de l'infection par voie intrapéritonéale.

A ce sujet, on pourrait objecter qu'une pareille expérience ne peut reproduire exactement l'évolution de l'infection typhoïdique chez l'homme, chez qui la maladie est habituellement provoquée par la pénétration de l'agent pathogène, par voie digestive et non intrapéritonéale, comme dans nos expériences. Nous considérons que cette objection ne saurait diminuer la valeur des résultats obtenus, vu qu'elle se rapporte uniquement à la voie qui détermine la maladie expérimentale, sans pouvoir nier l'état d'immunité générale, établie dans l'organisme des animaux vaccinés par voie orale. Il est certain que cette immunité s'est produite et qu'elle a pu être prouvée, indifféremment de la voie utilisée.

Il serait toutefois intéressant de savoir à quoi est due la résistance à l'infection par voie digestive de la souche des souris DBAO. A cette fin, nous avons effectué quelques essais, en partant de l'hypothèse d'une situation similaire à celle rencontrée chez d'autres animaux de laboratoire (ex. lapins), chez lesquels, grâce à l'acidité du suc gastrique et à l'évacuation lente de l'estomac dans le doudenum, l'infection par voie orale, même en doses très élevées de S. typhi murium, introduites par sonde, ne donne jamais de résultats positifs. (KOUTCHERJAVII F. K. (16)).

Dans le but de confirmer l'hypothèse mentionnée, nous avons administré aux souris de l'atropine (0,025 mg, en volume de 0,5 ml, voie sous-cutanée), introduisant après 15 minutes, par sonde, la dose infectante (1 milliard germes), suspendue dans du lait ou en solution tampon, en comptant vaincre, de cette manière, l'éventuelle barrière de l'acidité gastrique. Nos essais n'ayant pas donné de résultats concluants, nous en avons déduit que le mécanisme de cette résistance est plus complexe et qu'il revient à plusieurs autres facteurs (tissulaires ou d'autre nature). Pour élucider le problème de ce mécanisme, des recherches spéciales, supplémentaires, sont nécessaires.

CONCLUSIONS

Des recherches expérimentales du présent travail, concernant la méthode de vaccination mixte (orale — sous-cutanée) anti-typhoïdique, se détachent les faits suivants:

1. Dans l'infection expérimentale avec *S. typhi murium*, déclenchée par voie intrapéritonéale chez la souris appartenant à la lignée DBAO, la vaccination mixte (3 doses orales, à intervalles de 48 heures + 1 inoculation sous-cutanée, administrée 20 jours après la dernière dose orale) est capable de conférer aux animaux immunisés, un haut degré de résistance.

2. Dans les mêmes conditions, la vaccination par voie orale, peut, à elle seule, assurer une protection appréciable. Un effet similaire est obtenu par l'inoculation sous-cutanée du schéma de la vaccination mixte. L'association de la méthode orale, à l'inoculation sous-cutanée s'est avérée comme particulièrement valeureuse, vu qu'elle confère un degré supérieur de protection contre l'infection.

3. La concentration des doses orales de vaccin semble jouer un rôle secondaire, dans le cas où la densité en germes de ces doses dépasse une certaine limite.

4. Dans le schéma de la vaccination mixte, la substitution de l'intervalle de 48 heures, par celui de 7 jours entre les doses orales, ne paraît pas justifiée. Ces faits résultent tant des essais effectués sur l'homme, que des expériences sur la souris.

BIBLIOGRAPHIE

1. Benzoni G. D. — Boll. Ist. Sieroterap. Milanese, 1953, **32**, 463.
2. Combiesco D., Combiesco Cornelia et Vlădoianu I. R. — Studii şi Cercet. de Inframicrobiol., Microbiol. şi Parazitol., Acad. R.P.R., 1956, **7**, 131.
3. Guarnacci M. — Giorn. Batteriol. e Immunol., 1930, **23**, 352.
4. Gukovskaia O. A. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1953, No. 3, 62.
5. Istrati G. et Stefănesco V. — C. R. Soc. Biol., 1930, **105**, 912.
6. Koutcerjavii F. K. — Byoull. eksp. Biol. Med., 1956, No. 11, 48.
7. Negro G. — Giorn. Batteriol. e Immunol., 1935, 21.
8. Parvis O. — Giorn. Batteriol. e Immunol., 1939, **22**, 268.
9. Lustrea V. et Miroiu A. — Ardealul Medical, 1945, Nr. 11—12, 437.
10. Ruge H. — Zbl. f. Bakt., I. Orig., 1932, **124**, 267.
11. Russu V. V., Vlădoianu I. R., Naş Ligia, Muscan S., Blasiu H., Dancila E. et Totesco E. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1958, **17**, 45.
12. Russu V. V., Naş Ligia, Suciu T., Dorin P. et Ulmeanu C. — Microbiol., Parazitol., Epidemiol., S.S.M., Bucureşti, 1958, **3**, 257.
13. Zdrodovski P. F. — Problema reactivităţii în studiul infecţiei şi al imunităţii. (en russe) — Medghiz, Moscou, 1950.
14. Zoboli C. — Policlinico, Sez. Med., 1928, **12**, 647.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ВОПРОСУ СМЕШАННОЙ (пероральной и подкожной) ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ БРЮШНОГО ТИФА

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В последнее время в нашей стране испытывался, с благоприятными результатами, способ смешанной или комбинированной вакцинации против брюшного тифа (2, 11, 12).

Сущность способа состоит в ассоциации перорального и подкожного введения тифозно-паратифозной вакцины, в виду получения суммации всех преимуществ каждого способа в отдельности.

В настоящей работе авторы предприняли ряд дополнительных исследований ввиду возможного повышения эффективности этого способа активной противотифозной иммунизации.

Проведенные исследования дали возможность отметить следующее:

1. При экспериментальной инфекции с *S typhi murium.* вызванной внутрибрюшинным введением у мышей принадлежащих линии D.B.A.O, вакцинация смешанным способом (3 пероральные дозы с интервалами в 2 сутки + подкожная прививка спустя 20 дней от последнего перорального введения) способна обеспечить у иммунизированных животных высокую степень устойчивости.

2. В одинаковых условиях, пероральная вакцинация способна обеспечить сама, значительную степень защиты. Сходный эффект обеспечивает и подкожное введение, ассоциированое в программе смешанной вакцинации. Ассоциация перорального способа с подкожным, по вышеуказанной схеме, является повидимому особенно ценной, обеспечивая высокую степень защиты против инфекции.

3. Концентрация пероральных доз вакцины играет повидимому малозначительную роль, в случае когда содержимое вводимых доз превышает известное количество микробов.

4. В схеме смешанной вакцинации, применение интервала в 7 дней, вместо 2-х суток. между пероральными дозами, повидимому не обосновано. Данное положение основывается как на исследованиях, проведенных у людей, так и на опытах, проведенных на мышах

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE KOMBINIERTE (ORAL-SUBKUTANE) METHODE DER TYPHUSSCHUTZIMPFUNG.

ZUSAMMENFASSUNG

In letzter Zeit wurde in unserem Lande versuchsweise die gemischte oder kombinierte Methode der Typhusschutzimpfung, mit gutem Erfolg angewandt (2, 11, 12).

Das Prinzip der Methode besteht in der Verbindung der oralen und der subkutanen Verabreichung des T.A.B. — Impfstoffes, mit dem Zweck eine Summierung der durch jeden dieser beiden Wege gebotenen Vorteile zu erzielen.

In der vorliegenden Arbeit unternahmen die Verfasser eine Reihe von zusätzlichen experimentellen Untersuchungen, um den Wirkungsgrad dieses aktiven Typhusschutzimpfungsverfahrens möglicherweise zu verbessern.

Aus den durchgeführten Untersuchungen ergeben sich folgende Tatsachen:

1. Die kombinierte Schutzimpfung (3 Dosen *per os*, in Abständen von 48 Stunden + 1 subkutane Injektion, 20 Tage nach der letzten oralen Dosis) vermag geimpften Mäusen des Stammes D.B.A.O. einen erhöhten Grad von Widerstandsfähigkeit gegen die experimentelle auf intraperitonealem Wege hervorgerufene Infektion mit *S, typhimurium* zu verleihen.

2. Unter den gleichen Bedingungen, weist auch die rein perorale Verabreichung des Impfstoffes eine beachtliche Schutzwirkung auf. Eine ähnliche Wirkung übt auch die im Schema der kombinierten Schutzimpfung eingeschlossene, subkutane Injektion aus. Die Verbindung der peroralen Verabreichung mit der subkutanen Injektion, nach dem obigen Schema, scheint besonders wertvoll, da sie einen erhöhten Schutz gegen die Infektion hervorruft.

3. Die Konzentration der peroralen Impfstoffdosen scheint eine geringe Rolle zu spielen, sobald eine gewisse Keimdichte überschritten wird.

4. Die Verwendung von 7-tägigen Abständen, anstatt 48-stündiger, zwischen den peroralen Dosen, im Schema der kombinierten Schutzimpfung, scheint nicht berechtigt zu sein. Dies geht sowohl aus Versuchen am Menschen, als auch aus Mäuseexperimenten hervor.

EXPERIMENTAL INVESTIGATIONS CONCERNING THE COMBINED (ORAL-SUBCUTANEOUS) METHOD OF TYPHOID VACCINATION

SUMMARY

Of late, the mixed or combined method of typhoid vaccination has been put to trial in this country, with good results (2, 11, 12).

The principle of the method consists in associating the oral and the subcutaneous routes of administering T.A.B. vaccine, in order to sum up the advantages offered by each of these routes.

In the present work, the authors have carried out a series of supplementary experimental investigations with the aim of possibly improving the efficiency of this procedure of active immunization.

The investigations performed resulted in the following findings:

1. In mice of the D.B.A.O. strain, experimentally infected with *S. typhimurium* by the peritoneal route, combined immunization (3 oral doses at 48 hours' intervals + 1 subcutaneous inoculation, 20 days after the last oral dose) is apt to confer a higher degree of resistance to the immunized animals.

2. Under the same circumstances, vaccination *per os* may afford by itself a considerable degree of protection. A similar effect is obtained by subcutaneous inoculation, as associated in the schedule of mixed vaccination. Combination of the oral method with subcutaneous inoculation according to the above schedule appears to be particularly valuable, resulting in a higher degree of protection against the infection.

3. The concentration of oral doses seems to play a minor part, provided these doses exceed a certain amount of germs.

4. In the schedule of combined immunization, the adoption of 7 days' instead of 48 hours' intervals between oral doses does not appear to be justified. This results from trials in humans as well as from experiments in mice.

TESTS SUPPLÉMENTAIRES D'IDENTIFICATION DU *B. PSEUDOMONAS PYOCYANEA (Ps. aeruginosa)*. RÉACTION DE LA CYTOCHROME-OXYDASE ET LE COMPORTEMENT SUR LE MILIEU AVEC TRIPHÉNYLTÉTRAZOLIUM-CHLORID.

par

EUGENIA MEITERT, T. MEITERT et THEA HORODNICEANU

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de Cultures Microbiennes et de la Dysenterie)

— Manuscrit reçu le 1 juillet 1959 —

Depuis les travaux de GESSARD (1) concernant la technique d'identification des germes pyocyaniques et jusqu'aujourd'hui, de nombreuses recherches ont été entreprises, en vue de déterminer les caractères biologiques et biochimiques des germes du genre *Pseudomonas*, dont la classification présente encore de nombreuses difficultés.

Ce germe, de plus en plus fréquemment isolé des infections du tractus urinaire, des infections chirurgicales, des entérites et autres syndromes pathologiques et dont on constate souvent la prédominance à la suite de l'antibiothérapie, ainsi que la difficulté de l'identification rapide des germes non-pigmentés, du genre *Pseudomonas*, ont déterminé certains auteurs (KOWAKS 1956 (2), GABY et HADLEY, 1957 (3)), à chercher un test rapide d'identification, afin de pouvoir les différencier des germes de la famille des Entérobactériacées.

Le nombre des souches non-pigmentées des *Pseudomonas pyocyanea*, isolées dans la clinique, est assez élevé, en partant de 4% (GABY et HADLEY (3)), jusqu'à 19% (LUTZ et coll. (4)). Vu que la fermentation des sucres, la présence du pigment, la température de croissance et la formation du voile représentent des caractères de moindre importance, communs aussi à d'autres germes, GABY et HADLEY (3) proposent d'utiliser la propriété des souches de *Pseudomonas* pyocyanea d'oxyder, par la cytochrome-oxydase qu'elles possèdent, la diméthylparaphénylediamine, avec production de bleu d'indophénol, après addition d'alpha-naphtol. La technique de cette méthode est simple, rapide et facile à exécuter.

En dehors des tests biochimiques, de nombreux critériums ont été proposés pour la différenciation des espèces du germe *Pseudomonas*. Ainsi, KLINGE, en 1957(8) emploie la réaction du jaune d'œuf. SELENKA (1958 (9)) étudie dans le même but, la résistance accrue du *Ps. aeruginosa*, au triphényltétrazolium-chlorid (T.T.C.), en rapport avec d'autres espèces appartenant au même groupe. L'auteur montre que *Ps. aeruginosa* se développe et réduit fortement (à 37° C) la substance T.T.C., lorsque celle-ci est englobée dans la gélose, en concentration de 1%, alors que *Ps. fluorescens* et *Ps. putida* ne se développent pas sur ce milieu.

Dans la présente note, nous nous sommes proposés d'étudier la valeur de la réaction de la cytochrome-oxydase (étude proposée par Gaby et Hadley), comme test de différenciation de *Ps. pyocyanea* des autres germes, surtout de ceux appartenant à la famille des Entérobactériacées, ainsi que le test de différenciation de *Ps. pyocyanea*, proposé par Selenka(milieu T.T.C.).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

On a étudié la réaction de la cytochrome-oxydase sur 200 souches de *Ps. pyocyanea* et une souche de *Ps. mellea*, dont 156 souches pigmentées et 44 non pigmentées, ainsi que sur 105 diverses souches de la collection de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » comme suit: 24 souches de b. *Proteus*, 12 de *Klebsiella*, 1 de *faecalis alcaligenes*, 4 de *Serratia marcescens*, 10 de staphylocoques, 9 de b. dysentériques, 10 de *Salmonella*, 13 de b. *Coli*, 9 de *Streptococcus faecalis*, 10 de b. diphtériques et 3 souches de tétragène.

Les souches de *Ps. pyocyanea* ont été isolées de divers produits pathologiques, au cours de plusieurs années, et désignées comme telles d'après l'étude complète de leurs propriétés biochimiques et sérologiques.

En vue d'effectuer la réaction de la cytochrome-oxydase, on a utilisé les réactifs suivants: alpha-naphtol 1% en étanol 95% et solution aqueuse 1% de paraaminodiméthylaniline-oxalate. On a préparé des solutions hebdomadaires, afin d'éviter l'auto-oxydation du paraaminodiméthylanilineoxalate.

La réaction de la cytochrome-oxydase a été faite, tant sur cultures en bouillon de 18—24 heures, que sur cultures sur agar et agar-sang, en plaques (colonies isolées) de 24 heures.

La technique est la suivante: on ajoute à un tube de culture en bouillon (4—5 ml), 0,2 ml alpha-naphtol 1% et 0,3 ml paraaminodiméthylaniline-oxalate 1%. Après forte agitation, afin d'assurer le mélange et l'homogénéité, apparaît, dans le cas d'une réaction positive, 15—30 secondes après addition des réactifs, une coloration bleue, indiquant la présence de la cytochrome-oxydase.

Pour détecter l'enzyme dans les cultures en plaques, on mélange, en parties égales, les réactifs sus-mentionnés, et on ajoute quelques gouttes sur les colonies isolées. Sur les milieux habituels (gélose 2% et gélose sang), les colonies deviennent bleues au bout de 15—30 secondes. Les réactions positives, dont la lecture est faite 1 minute après addition des réactifs, ne sont pas prises en considération.

La résistance de *Pseudomonas* au T.T.C. a été déterminée sur un nombre de 166 souches de *Ps. pyocyanea* et sur 14 souches différentes (3 de *Serratia marcescens*, 7 de *Proteus* et 4 de b. *Coli*), isolées de divers produits pathologiques. Comme milieu de culture, on a utilisé la gélose nutritive habituelle, à pH = 7,6.

Après l'ensemencement des milieux avec les souches à étudier, on les a incubées 24 heures, à 37°, notant la croissance, ainsi que le degré de réduction du T.T.C.

RÉSULTATS

Les 200 souches de *Ps. pyocyanea*, ainsi que la souche de *Ps. mellea*, ont toutes donné une réaction cytochrome-oxydase positive en cultures sur agar et agar-sang et seulement 192 souches ont donné des réactions positives, dans les cultures en bouillon. Le faible développement en bouillon, des autres 8 souches

le *Ps. pyocyanea* explique probablement le fait que la réaction de la cytochrome-oxydase a été négative.

Des 105 différentes souches de la collection de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino », une seule souche de *faecalis alcaligenes* a donné une réaction nettement positive en cultures sur agar et cultures en bouillon; une souche de *Serratia marcescens* et deux souches de b. dysentériques ont donné une réaction faiblement positive, seulement dans les cultures en bouillon, tandis que trois souches de tétragène ont été positives seulement en cultures sur agar. Du reste des souches étudiées, aucune n'a donné une réaction cytochrome-oxydase positive, pas plus en cultures sur agar, qu'en bouillon. On a constaté chez les souches de *Klebsiella*, *Streptococcus faecalis* et b. diphtérique, une réaction positive en bouillon, 5 minutes après addition des réactifs.

En ce qui concerne la croissance sur gélose T.T.C. des souches de *Ps. pyocyanea*, on remarque que toutes les 166 souches se développent et réduisent fortement le T.T.C. (en concentration de 1%, aussi bien qu'en concentration de 1/500), après 24 heures à 37°, tandis que les souches de b. *Proteus*, b. *Coli* et *Serratia marcescens*, ne se développent pas sur ce milieu, même après 4 jours d'incubation.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Ainsi qu'il ressort des données du présent travail, la réaction de la cytochrome-oxydase est très sensible, simple et facile à exécuter, permettant l'identification rapide des germes du genre *Pseudomonas*. La réaction sur cultures en plaques est précise, facile à effectuer et très utile pour l'isolement du bacille pyocyanique d'une culture mixte. La réaction de la cytochrome-oxydase nous a été d'un aide précieux, tant pour élucider le problème de certaines souches non-pigmentées, diagnostiquées à tort comme b. pyocyaniques, que pour identifier les germes non-pigmentés de *Pseudomonas pyocyanea*, et qui, en réalité, appartenaient à d'autres espèces microbiennes.

La réaction du milieu liquide, plus laborieuse, risque d'être négative, lorsque la culture se développe faiblement. Lutz et coll. (4), pratiquant la réaction de la cytochrome-oxydase seulement en milieu liquide — d'après la technique de Gaby et Hadley — ne trouvent un test positif que chez 41% des souches, ce qui pourrait s'expliquer, soit par le faible développement des souches, soit par l'autolyse de celles-ci.

En ce qui concerne la spécificité de la réaction, on constate que seul le b. *faecalis alcaligenes* donne une réaction positive, alors que les autres cultures de *Klebsiella*, b. *Proteus*, b. *Coli*, b. typhiques, b. dysentériques, b. diphtériques, *Serratia marcescens*, *staphilococcus faecalis*, ont invariablement donné des réactions négatives. Les réactions positives des trois souches de tétragène, ne déprécient pas la valeur du test, la différenciation étant facile à effectuer d'après les caractères morphologiques.

Le milieu agar T.T.C., en concentration de 1% s'est montré favorable au développement de *Ps. pyocyanae* et défavorable à celui de certaines souches de b. *Coli*, b. *Proteus* et *Serratia marcescens*. D'après Wundt (10), la tolérance de b. *Coli* pour la T.T.C. est de 1%; toutefois, Selenka, ainsi que nous-mêmes, n'avons jamais constaté une croissance dans une pareille concentration, ni même dans celle de 1/500. Il en est de même pour le b. *Proteus* et *Serratia marcescens*. Toutes les 166 souches de *Ps. pyocyanea* se sont bien développées sur agar T.T.C. 1% et 1/500.

La réaction de la cytochrome-oxydase, ainsi que le milieu agar T.T.C. 1%, représentent des tests utiles pour l'identification de *Ps. pyocyanea*, dont l'exécution facile permet l'identification rapide de ce dernier, en cultures mixtes, ainsi que des souches de *Pseudomonas* non-pigmentées. Cependant, des recherches supplémentaires s'imposent, afin de nous rendre compte, à quel point la réaction de la cytochrome-oxydase est positive pour tous les membres du groupe *Pseudomonas* et si par l'utilisation du milieu T.T.C. des différenciations sont possibles dans ce groupe de germes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Gessard C. — Ann. Inst. Pasteur, 1920, **34,** 88.
2. Kowaks N. — Nature, 1956, **178,** 703.
3. Gaby et Hadley — J. Bact., 1957, **74,** 356.
4. Lutz A., Schaffer A. et Hoffer M. J. — Ann. Inst. Pasteur, 1958, **99,** 49.
5. Cernomordik A. B. — Jurn. Microbiol. Epidem. i Immunol. 1956, **27,** Nr. 4, 116
6. Cernomordik A. B. — Soviet. Med., 1957, **21,** Nr. 3, 57.
7. Bonciu O. — Rev. Ştiinţelor Medicale, 1946, **35,** 306.
8. Klinge K. — Arch. Hyg., 1957, **141,** 348
9. Selenka F. — Arch. Hyg., 1958, **142,** 81.
10. Wundt W. — Dtsch. Med. Wschrft., 1950, **75,** 1471.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ТЕСТЫ ДЛЯ РАСПОЗНАВАНИЯ СИНЕГНОЙНОЙ ПАЛОЧКИ. РЕАКЦИЯ ЦИТРОХРОМОКСИДАЗЫ И ПОВЕДЕНИЕ НА СРЕДЕ ТТС

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Описаны два дополнительных теста для распознования синегнойной палочки: реакция цитохромоксидазы (по Габи и Гадлей 1957) и поведение на среде ТТС (по Селенка Ф. 1958).

Изучали реакцию цитохромоксидазы у 200 штаммов *Ps. pyocyanea* и одного штамма *Ps. mellea* среди которых 156 штаммов, обладающих пигментом и 44 штаммов, лишенных пигмента, и у 105 разных штаммов: протея, клебсиелл, щелочеобразователя, *Serratia marcescens*, стафилококка, дизентериной палочки, салмонелл, кишечной палочки, энтерококка, дифтерийной палочки и тетрагена, пользуясь культурами на агаре и в бульоне.

Все 200 штаммов *Ps. pyocyanea* также как и штамм *Ps.mellea* оказались положительными в отношении цитохромоксидазы, на агаре и на кровяном агаре и только 192 штамма оказались положительными и в бульонных культурах.

Из 105 различных штаммов, только один штамм щелочеобразователя дал резко положительную реакцию, как в агаровых культурах, так и в бульоне, в то время как штамм *Serratia marcescens* и 2 штамма дизентерийной палочки дали положительную реакцию в бульоне, а 3 штамма тетрагена были положительными в культурах на агаре.

Устойчивость штаммов *Pseudomonas* по отношению к ТТС в 1% -ной и 1/500 концентрации изучалась на 166 штаммах *Ps.pyocyanea* и на 14 различных штаммах: *Serratia marcescens*, протея, кишечной палочки.

Все штаммы *Pseudomonas* развиваются и восстановляют интенсивно ТТС, как в концентрации 1%, так и в концентрации 1/500; протей, кишечная палочка и *Serratia marcesceus* не развиваются на данной среде.

Реакция цитохромоксидазы и агаровая среда ТТС 1% представляют собой хорошие тесты для идентификации синегнойной палочки, будучи легко проводимыми и давая возможность идентифицировать синегнойную палочку в течении короткого срока, как в смешанных культурах, так и лишенные пигмента штаммы.

ZUSÄTZLICHE TESTE ZUR IDENTIFIZIERUNG DES *B. PYOCYANEUS (Ps. AERUGINOSA)*. DIE CYTOCHROMOXYDASEREAKTION UND DAS VERHALTEN AUF TTC-NÄHRBODEN

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden zwei zusätzliche Teste zur Identifizierung des *B. pyocyaneus* beschrieben und zwar die Cytochromoxydasereaktion (nach Gaby und Hadley, 1957) und das Verhalten auf TTC-Nährboden (nach Selenka, 1958).

Die Cytochromoxydasereaktion wurde bei 200 Stämmen von *Ps. pyocyanea* und einem Stamm von *Ps. mellea* (davon 156 Pigment-bildende und 44 nicht Pigment-bildende), sowie bei 105 verschiedenen Stämmen von Proteusbazillen, *Klebsiella, B. faecalis, alcaligenes, Serratia marcescens*, Staphylokokken, Dysenteriebazillen, Salmonellen, Colibazillen, Enterokokken, Diphteriebazillen und Tetrakokken, in Agar-, Blutagar- und Bouillonkulturen untersucht.

Alle 200 Stämme von *Ps. pyocyanea* sowie der Stamm von *Fs. mellea* waren auf Agar und Blutagar Cytochromoxydase-positiv, während in Bouillonkulturen nur 192 Stämme positiv reagierten.

Von den 105 verschiedenen Stämmen, ergab nur ein Stamm von *B. faecalis alcaligenes*, sowohl in Agar — als auch in Bouillonkulturen, eine ausgesprochen positive Reaktion, während ein Stamm von *Serratia marcescens* und zwei Stämme von Dysenteriebazillen in Bouillonkulturen schwach positiv und 3 Tetrakokkenstämme in Agarkulturen positiv reagierten.

Die Wiederstandsfähigkeit von Pseudomonasstämmen gegen TTC in Konzentrationen von 1% und 1/500 wurde an 166 Stämmen von *Ps. pyocyanea* und 14 verschiedenen Stämmen von *Serratia marcescens*, Proteusbazillen und Colibazillen bestimmt.

Alle Pseudomonasstämme entwickeln sich und reduzieren TTC stark, sowohl in der Konzentration 1% als auch 1/500. Proteusbazillen, Colibazillen und *Serratia marcescens* entwickeln sich auf diesem Nährboden nicht.

Die Cytochromoxydasereaktion und das Verhalten auf TTC-Nährboden sind wertvolle Teste für die Identifizierung von *Ps. pyocyanea*. Sie sind leicht auszuführen und ermöglichen es, sowohl *Ps. pyocyanea* in Mischkulturen, als auch nicht Pigment-bildende Stämme, in kürzester Zeit zu identifizieren.

SUPPLIMENTARY TESTS FOR THE IDENTIFICATION OF *B. PYOCYANEUS (Ps. AERUGINOSA)*. The CYTOCHROME-OXIDASE REACTION AND THE BEHAVIOUR ON TTC MEDIUM.

SUMMARY

Two supplimentary tests are described for the identification of *B. pyocyaneus* i. e. the cytochrome-oxidase reaction (according to Gaby and Hadley, 1957), and the behaviour on TTC medium (according to Selenka, 1958).

The cytochrome-oxidase reaction was investigated in 200 strains of *Ps. pyocyanea* and one strain of *Ps. mellea*, out of which 156 pigmented, and 44 non pigmented strains, as well as in 105 different strains of: *B. proteus, Klebsiella, B. faecalis alcaligenes, Serratia marcescens, Staphylococcus, B. dysenteriae, Salmonella, B. coli, Enterococcus, C. diphtheriae*, and *Tetracoccus*, on agar and blood-agar as well as in broth cultures.

The 200 strains of *Ps. pyocyanea* as well as the strain of *Ps. mellea* all were cytochrome-oxidase-positive on agar and blood-agar, while only 192 strains were positive in broth cultures.

Of the 105 different strains, only one strain of *B. faecalis alcaligenes* gave clear-cut positive reactions in agar and broth cultures, while one strain of *Serratia marcescens* and 2 strains of dysenteric bacilli gave slightly positive reactions in broth, and 3 tetracoccus strains were positive in agar cultures.

The resistance of pseudomonas strains to 1% and 0,2% concentrations of TTC was determined in 166 strains of *Ps. pyocyanea* and different 14 strains of *Serratia marcescens*, *B. proteus*, and *B. coli*.

All strains of pseudomonas developed in the presence of and strongly reduced TTC in 1% or 0,2% concentrations; *B. proteus*, *B. coli*, and *Serratia marcescens* did not develop on this culture medium.

The cytochrome-oxidase reaction and 1% TTC-agar medium are valuable tests for the identification of *Ps. pyocyanea*. These tests are easy to carry out and afford the possibility of rapidly identifying *Ps. pyocyanea* in mixed cultures as well as non-pigmented strains of this species.

ÉTUDE CHIMIQUE COMPARATIVE DES DIFFÉRENTS TYPES DE MÉNINGOCOQUES

par

Eugenia Costin-Podhorski et Aurica Topciu

Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Services de Biochimie et des Cocci pathogènes)

— Manuscrit reçu le 8 juillet 1959 —

Le problème de la constitution chimique des germes a préoccupé depuis ongtemps divers auteurs. En ce qui concerne le méningocoque, la littérature le spécialité fournit trop peu de données (travaux datant de 1909) souvent ncomplètes, ce qui nous a déterminé à étudier la composition chimique des néningocoques, de même que les éventuelles différences existant entre les livers types.

MATÉRIEL

Souches de méningocoque utilisées:

Type A (52137); type B (52147); type C (52142), souches reçues en 1956 et 1957 de l'Institut Pasteur de Paris; type I (628) et type III (104), souches reçues en 1949 de l'Institut de Sérums de Prague.

Les cultures sont ensemencées dans des tubes de 18 mm/180 mm sur gélose-ascite. Après vingt heures d'incubation à 37°C, les cultures sont passées sur des plaques Roux (gélose avec macéré de viande peptonnée 40‰ et glucosée 2‰; pH = 7,6). Les cultures sont incubées à 37°C pendant vingt heures. Les germes séparés par centrifugation sont lavés à deux reprises avec la solution saline 0,85% et une fois à l'eau distillée, pour éloigner toutes traces du milieu de culture. Le dépôt microbien, repris avec de l'acétone, conservé pendant 24 heures à + 4°C, séparé par centrifugation, lavé à deux reprises à l'éther sulfurique, est séché jusqu'au poids constant et laissé à la température de la chambre jusqu'à l'évaporation complète de l'acétone et de l'éther. Les résidus sont repris d'abord à l'éther, ensuite au chloroforme, évaporés de nouveau et pesés au poids constant. Les valeurs obtenues seront ajoutées aux fractions correspondantes des lipides obtenus par l'extraction des germes (appareil Soxhlet).

On a déterminé les composants suivants:

I. — *Substances minérales totales.*

II. — *Substances organiques.*

III. — *Lipides :* lipides totaux; lipides éthéro-solubles; lipides chloroformo-solubles.

IV. — *Glucides totaux.*

V. — *Acides nucléiques :* acides nucléiques totaux; acide désoxyribonucléique; acide ribonucléique.

VI. — *Phosphore :* phosphore total; phosphore acido-soluble; phosphore nucléique.

VII. — *Azote :* azote total; azote acido-soluble; azote nucléique; azote aminique total; azote aminique libre; azote polypeptidique.

MÉTHODES ET RÉSULTATS

I. *Substances minérales totales.* Le résidu minéral (cendres) a été déterminé par la minéralisation au poids constant de 0,2 gr corps microbiens secs. Les résultats obtenus présentent de très petites variations pour les types A (52137), B (52147) et I (628), les valeurs moyennes étant d'environ 8 gr pour 100 gr corps microbiens secs. Le chiffre le plus bas est donné par le type C (52142) — 6.93 gr pour 100 gr corps microbiens secs et le type III (104) — 7.03 gr pour 100 gr corps microbiens secs. (Tableau I).

II. *Les substances organiques* extraites des cinq souches utilisées ne présentent pas de trop grandes différences, les valeurs moyennes étant 92,40 gr pour 100 gr corps microbiens secs. (Tableau I).

Tableau I

Grammes pour 100 gr corps microbiens secs

Composants	Souches étudiées				
	Type A (52137)	Type B (52147)	Type C (52142)	Type I (628)	Type III (104)
Résidu minéral	8,30	7,70	6,93	8,03	7,03
Substances organiques	91,70	92,30	93,07	91,97	92,97
Lipides totaux	10,04	9,33	10,46	10,80	10,25
Lipides éthéro-solubles	9,01	8,68	9,59	9,70	9,10
Lipides chloroformo-solubles	1,03	0,64	0,87	1,10	1,15
Glucides totaux	13,40	12,19	13,34	14,05	14,18
Acides nucléiques totaux	15,05	14,56	13,60	15,02	15,85
Acides désoxyribonucléiques	3,62	3,03	3,32	3,30	3,70
Acide ribonucléique	11,43	11,53	10,28	11,72	12,15
Rapport: $\frac{\text{acides désoxyribonucléiques}}{\text{acides nucléiques totaux}}$	0,24	0,20	0,24	0,22	0,23
Phosphore total	2,60	2,37	1,93	2,50	2,56
Phosphore acido-soluble	1,08	0,99	0,90	0,99	1,15
Phosphore nucléique	1,59	1,49	1,36	1,51	1,53
Azote total	13,18	13,26	13,69	13,01	14,00
Azote acido-soluble	1,80	1,75	1,82	1,50	2,10
Azote nucléique	1,50	1,44	1,34	1,50	1,58
Azote aminique total	0,315	0,168	0,136	0,301	0,155
Azote aminique libre	0,248	0,133	0,100	0,233	0,130
Azote polypeptidique	0,067	0,035	0,036	0,068	0,025
Protéines totales	61,75	62,93	65,81	62,56	64,50

III. *Lipides. Dosage des lipides totaux et des fractions éthéro-solubles et chloroformo-solubles.* Les corps microbiens conservés dans l'acétone pendant 24 heures à +4°C, après leur séparation, sont lavés à deux reprises à l'éther sulfurique et séchés au poids constant. Après pesage, on les passe dans un cartouche extracteur et on les soumet à des extractions successives (appareil Soxhlet) pen-

nt 16 heures, dans de l'alcool éthilique à 96°, ensuite avec de l'éther sulfurique ultérieurement avec le mélange: 0,5 alcool éthilique à 96°, 1,5 éther sulfurique, e part éther de pétrole, une part chloroforme et une part alcool méthylique. s lipides d'extraction sont évaporés séparément (bain de sable) et les résidus nt repris d'abord à l'éther sulfurique, ensuite au chloroforme. Les extraits érés et chloroformés sont évaporés et séchés jusqu'au poids constant. acétone et l'éther sulfurique, utilisés au lavage et au séchage des corps microns sont soumis aux mêmes opérations et les valeurs obtenues ajoutées aux leurs données par les extractions à l'aide de l'appareil Soxhlet. On obtient nsi deux fractions: la première fraction comprend la totalité des substances éthéro-solubles et la seconde, la totalité des substances chloroformo-solubles.

Lipides totaux : quatre souches ne présentent pas de différences marquées, moyenne des valeurs étant 10,39 gr pour 100 gr corps microbiens secs; les leurs données par la souche B (52147) sont légèrement réduites.

Lipides éthéro-solubles : quatre souches, donnent des chiffres rapprochés, moyenne des valeurs étant 9,35 gr pour 100 gr corps microbiens secs; les leurs données par la souche B (52147) sont légèrement réduites.

Lipides chloroformo-solubles : trois souches donnent des valeurs rapprochées, moyenne 1,09 gr pour 100 gr corps microbiens secs; une souche — C 2142) des valeurs légèrement réduites: 0,87 gr pour 100 gr corps microbiens s et une autre — B (52147) des valeurs encore plus petites: 0,64 gr pour 100 corps microbiens secs (Tableau I).

IV. *Glucides totaux.* On détermine les glucides totaux sur les hydrolysats s germes acétonnés: 0,1 gr corps microbiens soumis à l'hydrolyse pendant q heures dans un milieu d'acide chlorhydrique N/1. On détermine ensuite glucides totaux dans l'hydrolysat neutralisé par la méthode Hagedorn-nsen.

Les résultats obtenus montrent que parmi les souches étudiées, quatre présentent des variations ne dépassant pas les limites des erreurs expérimentales, la oyenne des valeurs trouvées étant de 13,74 gr pour 100 gr corps microbiens s, tandis que la souche B (52147) donne des valeurs plus réduites — 12,19 gr ur 100 gr corps microbiens secs (Tableau I).

V. *Acides nucléiques.* En ce qui concerne la détermination des acides nucléiques, nous attirons l'attention sur la monographie de Cepinoga (3), qui offre matériel documentaire important. Les résultats obtenus par nos expériences, t été les suivants:

Les acides nucléiques totaux ont été extraits par la méthode préconisée par hneider (12) pour les tissus et adaptée par Vendrely (1) aux bactéries.

Les germes acétonnés sont repris dans de l'acide trichloracétique 5% en oportion de 1 gr corps microbiens pour 100 ml d'acide, gardés pendant la it à +4°C. Le liquide surnageant est éloigné quantitativement par centrifugan et le dépôt lavé à froid avec de l'acide trichloracétique. On réunit les extraits chloracétiques, destinés à la détermination de l'azote acido-soluble, du phosore acido-soluble, de l'azote aminique total, de l'azote aminique libre et de zote polypeptidique. Le résidu est resuspendu dans l'acide trichloracétique % et laissé au bain marie à 90°C pendant 15'. Le liquide surnageant est récolté antitativement par centrifugation et le dépôt est soumis à plusieurs extracns à chaud, jusqu'à la négativation de la réaction de Dische dans le liquide centrifugation.

Les extraits trichloracétiques à chaud réunis sont ramenés à un volume défini. Sur une portion de cet extrait, nous dosons les purines correspondantes à l'acide désoxyribonucléique et ribonucléique. L'extrait est soumis à l'hydrolyse dans un milieu d'acide chlorhydrique (concentration finale N/1) pendant deux heures. Cet intervalle est nécessaire pour obtenir la libération de toutes les purines qui seront dosées par précipitation sous forme de sel de cuivre, selon la technique de KRÜGER et SCHMIDT (7), appliquée par BOIVIN et MESROBEANU (2) à l'étude des purines bactériennes. L'azote purique est dosé à l'aide de l'appareil Kjeldahl pour les sels de cuivre des bases puriques et ensuite par la distillation de l'azote ammoniacal (appareil PARNAS-WAGNER) (11).

L'acide désoxyribonucléique a été dosé directement sur une autre portion des extraits trichloracétiques, à chaud, selon la méthode de Dische et l'acide ribonucléique a été calculé par différence entre les acides nucléiques totaux et l'acide désoxyribonucléique.

Les acides nucléiques totaux présentent des valeurs du même ordre pour quatre souches — moyenne des valeurs 15,12 gr pour 100 gr corps microbiens secs, et une tendance à la diminution pour la souche C (52142) dont la valeur est 13,60 gr pour 100 gr corps microbiens secs; les acides désoxyribonucléiques et ribonucléiques des cinq souches étudiées ne présentent pas des valeurs différentes, la moyenne pour l'acide désoxyribonucléique étant 3,39 gr pour 100 gr et pour l'acide ribonucléique — 11,42 gr pour 100 gr corps microbiens secs. Le rapport acide désoxyribonucléique-acides nucléiques totaux présente des valeurs du même ordre de grandeur, la moyenne étant 0,23. (Tableau I).

VI. *Phosphore total — phosphore acido-soluble, phosphore nucléique.* Phosphore total: 0,005 gr corps microbiens sont soumis à la combustion directe en présence de l'acide sulfurique et du perhydrole; la détermination se fait sur le résidu, selon la méthode Briggs. Le phosphore acido-soluble et le phosphore nucléique sont déterminés selon la méthode indiquée plus haut; le premier sur extrait trichloracétique à froid, et le second sur extrait trichloracétique à chaud.

Sur quatre souches le phosphore total déterminé présente de très petites variations, la moyenne des valeurs étant 2,50 gr pour 100 gr corps microbiens secs; la souche C (52142) donne un chiffre plus réduit — 1,93 gr pour 100 gr corps microbiens secs. Le phosphore acido-soluble et le phosphore nucléique des cinq souches étudiées présentent de très petites variations, la moyenne des valeurs pour le phosphore acido-soluble étant 1,02 gr pour 100 gr corps microbiens secs et pour le phosphore nucléique 1,50 gr pour 100 gr corps microbiens secs (Tableau I).

VII. *Azote total, azote acido-soluble, azote nucléique, azote aminique total, azote aminique libre et azote polypeptidique.* L'azote total des germes traités à l'acétone est dosé à l'aide de l'appareil Kjeldahl; l'azote acido-soluble par la kjeldahlisation à froid de l'extrait trichloracétique; l'azote nucléique par la kjeldahlisation de l'extrait trichloracétique, à chaud, et la distillation ultérieure de l'azote ammoniacal à l'aide de l'appareil Parnas-Wagner. L'azote aminique total est déterminé à froid sur une portion de l'extrait trichloracétique, selon la méthode POPE et STEVENS (9) après hydrolise préalable de quatre heures en milieu d'acide chlorhydrique N/1. Sur une autre portion du même extrait, on détermine directement l'azote aminique libre, selon la méthode indiquée. La différence entre l'azote aminique total et l'azote aminique libre représente l'azote polypeptidique.

L'azote total pour les cinq souches est en moyenne 13,43 gr pour 100 gr rps microbiens secs; l'azote acido-soluble présente de très petites différences ur quatre souches, la moyenne des valeurs étant 1,87 gr pour 100 gr corps icrobiens secs, tandis que le type I (628) présente 1,50 gr pour 100 gr corps icrobiens secs, au lieu de 1,87 (moyenne). Pour l'azote nucléique, la moyenne été de 1,47 gr pour 100 gr corps microbiens secs. Pour l'azote aminique total ois souches donnent (en moyenne) les valeurs 0,153 gr pour 100 gr corps icrobiens secs; deux autres souches présentent des valeurs sensiblement plus andes: la souche A (52137) — 0,315 gr et la souche I (628) — 0,301 gr pour 0 gr corps microbiens. L'azote aminique libre présente de très petites différnces: sur trois souches la moyenne des valeurs est d'environ 0,121 gr pour 0 gr corps microbiens secs; la souche A (52137), de même que le type I 28), présentent des valeurs plus élevées, soit 0,248 gr pour 100 gr corps icrobiens secs pour la souche A et 0,233 gr pour 100 gr corps microbiens cs pour le type I. L'azote polypeptidique présente des valeurs rapprochées ur les souches B (52147), C (52142) et type III (104), la moyenne des valeurs nt 0,032 gr pour 100 gr corps microbiens secs; la valeur augmente sensiblement: pour la souche A (52137), 0,067 gr pour 100 gr corps microbiens secs et ur le type I (628), 0,068 gr pour 100 gr corps microbiens secs (Tableau I).

Les protéines totales des cinq souches étudiées présentent de très petites riations, la moyenne des valeurs étant 63,51 gr pour 100 gr corps microbiens cs. (Tableau I). Leur valeur est calculée à partir du chiffre d'azote total après duction de l'azote acido-soluble et de l'azote nucléique multiplié par 6,25.

CONCLUSIONS

La composition chimique de cinq souches de méningocoque de différents pes A, B, C, type I et type III a été analysée en déterminant les composants ivants: le résidu minéral, les substances organiques, les lipides totaux, les lipis éthéro-et chloroformo-solubles, les glucides totaux, les acides nucléiques taux, les acides désoxyribonucléiques et ribonucléiques, le phosphore total, phosphore acido-soluble, le phosphore nucléique, l'azote total, l'azote acidoluble, l'azote nucléique, l'azote aminique total, l'azote aminique libre, l'azote lypeptidique et les protéines totales.

Les valeurs des composants chimiques déterminées pour les types de méningocoque étudiés ne présentent pas de différences appréciables, à l'exception l'azote aminique total, l'azote libre et l'azote polypeptidique, qui présentent s valeurs sensiblement plus élevées pour le type A (52137) et le type I (628).

BIBLIOGRAPHIE

Boivin A., Vendrely R. et Tulasne E. — Bull. Acad. Méd. 1947, **131**, 39, 561.

Boivin A. et Mesrobeanu L. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiol., 1934, **7**, 95.

Cepinoga O. P. — Les acides nucléiques et leur rôle biologique. Ed. Med. 1958., Bucarest

Ditthorn et Goldmeister. — Hyg. Rundschau 1909, **19**, 1.

Dâmboviceanu A. et Barber C. — Arch. Roum. de Pathol. exp. et de Microbiol., 1931, **4**, 26.

Gosteev V. S. — Les bases biochimiques de la bactériologie médicale. Ed. de l'Etat (Ed. de Stat) 1953. Moscou.

Krüger N. et Schmidt G. — Zeit. Physiol. Chem., 1905, **8**, 1.

8. Mesrobeanu L. — Arch. Roum. de Pathol. exp. et de Microbiol., 1936, **9**, 12.
9. Pope C. G. et Stevens M. F. — Bioch. J., 1932, **33**, 1070.
10. Porter J. R. — Bacterial Chemistry and Physiology Ed. John Willey and Sons New-York 1950.
11. Steudel H. et Sung-Shen-Chou. — Zeit. Physiol. Chem., 1921, **116**, 223.
12. Schneider W. O. — J. Biol. Chem. 1945, **161**, 293.
13. Topley Wilson's. — Principles of bacteriology and Immunity London IV. Ed. 1955

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ РАЗНЫХ ШТАММОВ МЕНИНГОКОККА

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Анализировали химический состав 5 штаммов менингококка, принадлежащих к разным типам (A, B, C, тип I и тип III), определяя следующие компоненты: минеральный остаток, органические вещества, общие жиры, жиры растворимые в эфире и в хлороформе, общие углеводы, общие нуклеиновые кислоты, дезоксирибонуклеиновую и рибонуклеиновую кислоту, общий фосфор, фосфор растворимый в кислотах, нуклеиновый фосфор, общий азот, азот, расствоpимый в кислотах, нуклеиновый азот, общий аминный азот, свободный аминный азот, полипептидный аминный азот и общий белок.

Не отмечены значительные различия в содержании химических компонентов, определяемых у разных типов менингококка, с исключением общего свободного и полипептидного аминного азота, показатели которого очень увеличены у типа A (52137) и у типа I—(628)

VERGLEICHEND-CHEMISCHE UNTERSUCHUNG VERSCHIEDENER TYPEN VON *MENINGOKOKKEN*

ZUSAMMENFASSUNG

Die chemische Zusammensetzung wurde bei 5 Meningokokkenstämmen verschiedener Typen (A, B, C, Typus I und Typus III) untersucht. Es wurden folgende Bestandteile bestimmt: Mineralrückstand, organische Substanzen, Gesamtlipoide, Ether- und Chloroformlösliche Lipoide, Gesamtkohlehydrate, Gesamtnucleinsäuren, Desoxyribonucleinsäuren und Ribonucleinsäuren, Gesamtphosphor, säurelöslicher Phosphor, Nucleinphosphor, Gesamtstickstoff, säurelöslicher Stickstoff, Nucleinstickstoff, Gesamtaminostickstoff, freier Aminostickstoff, polypeptidischer Aminostickstoff und Gesamteiweiss.

Zwischen den Werten der untersuchten chemischen Bestandteile bestehen bei verschiedenen Meningokokkenstämmen keine erheblichen Unterschiede, mit Ausnahme des gesamten, freien und polypeptidischen Aminostickstoffes, die bei den Typen A (52137) und I (628) stark erhöht sind.

A COMPARATIVE CHEMICAL STUDY OF VARIOUS TYPES OF *MENINGOCOCCI*

SUMMARY

The chemical composition of five strains of meningococci belonging to different types (A, B, C, Type I, and Type III) was investigated.

The following determinations were performed: mineral residue, organic substances, total lipids, ether- and chloroform-soluble lipids, total carbohydrates, total nucleic acids, desoxyribonucleic and ribonucleic acids, total phosphorus, acid-soluble phosphorus, nucleic phosphorus, total nitrogen, acid-soluble nitrogen, nucleic nitrogen, total amino-acid nitrogen, free aminic nitrogen, polypeptidic amino-nitrogen, and total proteins.

No appreciable differences were found to exist between the different types of meningococci as regards the chemical components investigated, with the exception of total, free, and polypeptidic amino-nitrogen which are considerably increased in types A (52137) and I (628).